

PCT/JP2004/011480

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.08.2004

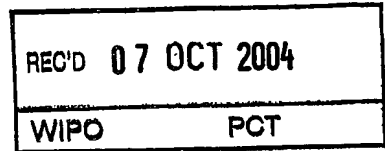
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 3 月 2 4 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 8 6 1 2 9
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 8 6 1 2 9]

出 願 人
Applicant(s): タカラバイオ株式会社

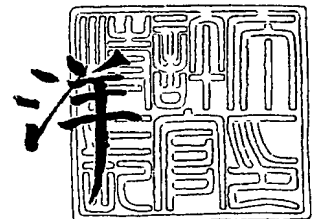


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 5 9 6 3

【書類名】 特許願
【整理番号】 T-1882
【提出日】 平成16年 3月24日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
C12N 9/22

【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
 【氏名】 佐川 裕章

【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
 【氏名】 友野 潤

【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
 【氏名】 上野 はるみ

【発明者】
 【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内
 【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】
 【識別番号】 302019245
 【氏名又は名称】 タカラバイオ株式会社
 【代表者】 加藤 郁之進

【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 173212
 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

dsRNA分解活性を有するタンパク質であって、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成する活性を有することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、Dicerの機能ドメインを有することを特徴とする請求項1記載のタンパク質。

【請求項 3】

Dicerの機能ドメインが、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなることを特徴とする請求項2記載のタンパク質。

【請求項 4】

さらにPAZドメインを含むことを特徴とする請求項3記載のタンパク質。

【請求項 5】

特定の長さのdsRNAが、約15～30塩基対のdsRNAであることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 7】

dsRNA分解活性を有するタンパク質が、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

請求項1～7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造する方法であって、コドンに宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項 9】

請求項1～7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法であって、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質の製造方法。

【請求項 10】

請求項1～7のいずれか1項に記載のdsRNA分解活性を有するタンパク質を含有するキット。

【請求項 11】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下でdsRNAにdsRNA分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さのdsRNAを生成することを特徴とするdsRNAの分解方法。

【請求項 12】

核酸結合活性を有するタンパク質とdsRNA分解活性を有するタンパク質が融合タンパク質であることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項 13】

核酸結合活性を有するタンパク質が、RNA結合活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項11又は12に記載の方法。

【請求項 14】

RNA結合活性を有するタンパク質がコールド ショック プロテインであることを特徴

とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】

コールド ショック プロテインがサーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

特定の長さの dsRNA が、約 15 ～ 30 塩基対の dsRNA であることを特徴とする請求項 11 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質であることを特徴とする請求項 11 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

dsRNA 分解活性を有するタンパク質が、天然型 Dicer あるいはその機能的同等物であることを特徴とする請求項 11 ～ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で RNA 合成活性を有するタンパク質を用いて RNA 合成反応を行うことを特徴とする RNA の合成方法。

【請求項 21】

核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を用いることを特徴とする請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

核酸結合活性を有するタンパク質が、コールド ショック プロテインであることを特徴とする請求項 20 又は 21 記載の方法。

【請求項 23】

コールド ショック プロテインが、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であることを特徴とする請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

コールド ショック プロテインが、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B であることを特徴とする請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

RNA 合成活性を有するタンパク質が、DNA 依存性 RNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 20 ～ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

請求項 11 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びに dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 27】

請求項 11 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【請求項 28】

請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物。

【請求項 29】

請求項 20 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】dsRNA分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質を用いたdsRNA分解方法ならびにRNA合成方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の長さのdsRNAを生成する活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質、当該タンパク質と核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質を組み合わせたdsRNAの効率的な分解方法並びに核酸結合活性を有するタンパク質とRNA合成活性を有するタンパク質を組み合わせたRNAの効率的な合成方法に関する。

【背景技術】

【0002】

最近、低分子dsRNAを利用する遺伝子工学的手法が報告されている。

例えば、RNA干渉(RNAi: RNA interference)は、dsRNAによってその配列特異的にmRNAが分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。dsRNAによって遺伝子サイレンシングができることがわかった発端は、線虫におけるアンチセンスを用いた研究からであった。1995年、GuoとKempnesはpar-1と呼ばれる遺伝子をアンチセンスRNAで抑制する実験を行なった。アンチセンスRNAを加えると、予想通りpar-1の発現を抑制したが、驚いたことに、コントロールとして用いたセンスRNAも同様にpar-1の発現を抑制し、par-1変異株の表現形を示した。(例えば、非特許文献1)

この矛盾は、1998年にFireらによって解き明かされた。アンチセンスRNAとセンスRNAを、それぞれRNAポリメラーゼを用いて合成するとき、わずかに非特異的に逆向きのRNAができてしまう。そのコンタミネーションによってできるdsRNAが遺伝子サイレンシングの本体であり、アンチセンスRNAおよびセンスRNAは遺伝子の発現を抑制できないこと、またアンチセンスRNAとセンスRNAをアニールさせたdsRNAが効率よく遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。(例えば、非特許文献2)

【0003】

上記RNA干渉においては、Dicerと呼ばれる酵素がdsRNAから小分子のRNA(siRNA: short interfering RNA)を生成させる。(例えば、非特許文献3)

この酵素の作用により生じたsiRNAは、RISC(RNA induced silencing complex)と呼ばれる複合体に取り込まれ、該複合体が標的mRNAを認識し、分解すると考えられている。しかしながら、RNA干渉に関与すると考えられる各因子についての正確な機能についてはまだまだ未知の部分が多いのが現状であった。(例えば、非特許文献4)

【0004】

上記RNA干渉を効率よく行うためには、dsRNAならびにsiRNAを効率よく生成させることが重要である。上記Dicerとしてはヒト由来Dicer(例えば、非特許文献5)が例示され、さらにリコンビナントDicer(例えば、非特許文献6)がジーンセラピーシステムズ社あるいはストラタジーン社より販売されている。

しかしながら、上記のようリコンビナントDicerについては、本来の酵素学的な性能を十分に発揮しているかどうかについては詳細に検討されていない。また、上記Dicerの少なくともどのドメインを含有すれば、dsRNAに作用させて好適なdsRNA(siRNA)を生成させる活性を保持することができるか、さらにその遺伝子工学的な生産性を向上できるかについては知られていない。

さらに、dsRNAを効率よく生成させる方法についても特に有効な方法は知られていないのが現状であった。

【0005】

さらに、RNAポリメラーゼを用いて合成した約21ヌクレオチドの鎖長のdsRNAをそのままsiRNAとして利用する方法も報告されている（例えば、非特許文献7）。従って、RNAが効率よくできる方法があれば上記方法にも利用できる。

【0006】

【非特許文献1】Guo S. 他1名 Cell 1995年 vol. 81, p611-620

【非特許文献2】Fire A. 他5名 Nature 1998年 vol. 39, p806-811

【非特許文献3】Bernstein E. 他3名 Nature 2001年 vol. 409, p363-366

【非特許文献4】Tabara H. 他3名 Cell 2002年 vol. 109, p861-871

【非特許文献5】Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885

【非特許文献6】Myers J. W. 他3名 Nature biotechnology 2003年 vol. 21, p324-328

【非特許文献7】Donze O. 他1名 Nucleic Acids Research 2002年 vol. 30, No. 10, e46

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0007】**

本発明の課題は、特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質の提供、RNA干渉等に利用可能な特定の長さのdsRNAを効率よく生成させる方法並びにRNA合成の促進方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】**【0008】**

本発明者らは、上記課題を解決するため、鋭意検討した結果、Dicerの機能ドメインを解析し、長鎖のdsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成させる活性を有する、dsRNA分解活性を有するタンパク質を見出した。また、核酸結合活性を有するタンパク質、例えばRNA結合活性を有するタンパク質の共存下でdsRNAにdsRNA分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さのdsRNAを効率よく調製できること、さらに当該核酸結合活性を有するタンパク質がdsRNA合成に代表されるRNA合成反応においてもその効率を向上させることを見出し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明の第1の発明は、dsRNA分解活性を有するタンパク質であって、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成する活性を有することを特徴とするdsRNA分解活性を有するタンパク質に関する。

本発明の第1の発明において、dsRNA分解活性を有するタンパク質は、Dicerの機能ドメインを有することが好ましく、例えば、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるものが好ましい。さらに、PAZドメインを含んでも良い。また、本発明の第1の発明のタンパク質を用いることにより、特定の長さのdsRNAが約15～30塩基対のdsRNAを生成させることができる。また本発明の第1の発明のタンパク質としては、dsRNA分解活性を有するタンパク質が配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質が例示される。あるいは、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもよい。また、本発明の第1の発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、コドンで宿主での発現に適したものに交換することによって、あるいはレアコドンに対する補強がなされた宿主を使用する

ことによって効率よく製造することができる。

また、当該タンパク質を低温誘導性ベクターを用いて発現させることができる。さらに本発明の第1の発明のタンパク質は、コンポーネントとしてキットに含有させることができる。

【0010】

本発明の第2の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で dsRNA に dsRNA 分解活性を有するタンパク質を作用させ、特定の長さの dsRNA を生成することとを特徴とする dsRNA の分解方法に関する。

本発明の第2の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、核酸結合活性を有するタンパク質は、RNA 結合活性を有するタンパク質であっても良い。当該 RNA 結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B が例示される。

本発明の第2の発明の方法により、特定の長さの dsRNA が、約 15～30 塩基対の dsRNA を生成することができる。さらに、本発明の第2の発明において、dsRNA 分解活性を有するタンパク質は、本発明の第1の発明のタンパク質であっても良いし、天然型 Dicer あるいはその機能的同等物であっても良い。

【0011】

本発明の第3の発明は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下で RNA 合成活性を有するタンパク質を用いて RNA 合成反応を行うことを特徴とする RNA の合成方法に関する。

本発明の第3の発明において、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質は融合タンパク質であっても良い。また、当該核酸結合活性を有するタンパク質は、コールド ショック プロテインであってもよく、その由来は好熱性菌あるいは耐熱性菌由来であっても良い。特に限定はされないが例えば、サーモトガ マリティマ由来のコールド ショック プロテイン B が例示される。さらに、RNA 合成活性を有するタンパク質は DNA 依存性 RNA ポリメラーゼであってもよい。

【0012】

本発明の第4の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質並びに dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

【0013】

本発明の第5の発明は、本発明の第2の発明の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

【0014】

本発明の第6の発明は、本発明の第3の発明の方法に用いるための組成物であって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とする組成物に関する。

【0015】

本発明の第7の発明は、本発明の第3の方法に用いるためのキットであって、核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質を含有することを特徴とするキットに関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、特定の長さの dsRNA を調製できる dsRNA 分解活性を有するタンパク質が提供される。さらに本発明により、RNA 干渉等に利用できる特定の長さの dsRNA を効率よく生成させることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本明細書においてDicerとは、RNAiの初期段階で長鎖のdsRNAをsiRNAにプロセッシングできる機能を有するタンパク質のことを言う。天然型のDicerとしては、とくに限定はされないが例えばN末端側よりATP結合ドメイン、RNAヘリカーゼドメイン、機能未知なPAZドメイン、RNaseIIIa及びbドメイン、さらにdsRNA結合ドメインから構成されているものが挙げられる。

【0018】

本明細書において、Dicerの機能ドメインとは、長鎖dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成できる活性に関与する領域をコードする部位のことを言う。

【0019】

上記機能ドメインとしては、特に限定はされないが例えば、RNaseIIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインからなるものが例示される。当該RNaseIIIa、bドメインは、Zhang H. 他4名 The EMBO Journal 2002年 vol. 21, No. 21, p5875-5885に記載のように、2本鎖RNAに特異的に作用し、5'末端にリン酸基をもつ特定の鎖長のオリゴヌクレオチドを生成させる活性に関与する領域をコードする部位であっても良い。さらに、dsRNA結合ドメインは、2本鎖RNAに特異的に結合する活性をコードする部位であっても良い。

【0020】

本明細書においてdsRNAとは、RNA干渉の対象となるmRNAと該mRNAに相補的な塩基配列を有するRNAとの2本鎖構造を形成したRNAのことを言う。

また、本明細書においてdsRNAの分解反応による生成物の応用例としては、主に以下に示すsiRNAがある。

【0021】

本明細書において特定の長さのdsRNAとは、特に限定はされないが例えば、約10～100塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAのことを言う。さらに、約15～30塩基対の範囲中の特定の長さ、特に20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAであっても良い。これらのdsRNAは、siRNAとして使用できる。

【0022】

本明細書において核酸結合活性を有するタンパク質とは、一本鎖または二本鎖のDNA、RNAに結合する活性を有するタンパク質のことを言う。当該タンパク質としては、核酸の二次構造を解消する機能を有するものが好ましく、例えば、DNAヘリカーゼ、RNAヘリカーゼあるいはその機能的同等物が挙げられる。

【0023】

本明細書において低温誘導性ベクターとは、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターのことを言い、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

【0024】

本明細書においてコールド ショック プロテインとは、本来の生育条件よりも低温になるような状況下でその温度低下により刺激されて発現されるタンパク質の総称を言う。

【0025】

本明細書において基質となる長鎖のdsRNAを完全に分解するとは、分解反応後に未切断の基質となる長鎖のdsRNAが電気泳動法において確認されない程度に分解することを言う。

【0026】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、該タンパク質の製造方法ならびに該タンパク質を含有するキット

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、dsRNAに作用して特定の長さのdsRNAを生成することができる。当該dsRNA分解活性を有するタンパク質としては、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば特に限定

はなく、例えば、Dicerの機能ドメインを有するタンパク質が例示される。当該Dicerの機能ドメインは、RNaseIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質であっても良い。また、長鎖のdsRNAから特定の長さのdsRNAを生成できるものであれば、そのタンパク質の由来は問わない。

当該RNaseIIa、bドメイン並びにdsRNA結合ドメインは、特に限定はされないが例えばヒト由来Dicerの場合、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列のN末端側のアミノ酸1271～1924（配列表の配列番号2記載の塩基配列番号3811～5772）を有するものが挙げられる。例えば、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）あるいは配列表の配列番号12記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号13記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）が例示される。

また、Dicerはサイズの大きいタンパク質であり、組換え体を製造するのに適していない。一方、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、ネイティブな酵素に比べてサイズが小さくコンパクトであり、組換え体を製造するのに有用である。一般に、ヒトなどの高等生物由来の酵素を組換え体として大腸菌などのバクテリア細胞で製造する場合、同等の酵素活性を保持したまま組換え体を製造することは困難を伴うことが多い。従って、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、その由来となる生物以外の細胞で製造する際に非常に有用である。

【0027】

さらに本発明のタンパク質においては、PAZドメインを含有していても良く、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）あるいは配列表の配列番号18記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号19記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質（Dicer変異体）が例示される。

【0028】

さらに、変異体により、さらに酵素的に安定なものにすることが可能である。特に限定はされないが、例えば、PAZドメイン+RNaseIIIDメインの場合、RNaseIIIDメインのみの変異体タンパク質に比べて安定性を向上させることができる。より多くの凍結、融解を施した場合でも活性を保持でき、またある保存緩衝液中では溶液状態でより長期間の活性保持が可能である。

【0029】

本発明のタンパク質は、特に限定はされないが例えば、長鎖dsRNAを分解し、RNA干渉に有効なsiRNAを生成させることができる。

また、上記機能を有する範囲であれば上記アミノ酸配列あるいは塩基配列において、一ないしは複数個のアミノ酸あるいは塩基の置換、欠失、挿入あるいは付加されたものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。

特に限定はされないが、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、PerfectDB配列等）、発現タンパク質精製のタグ配列（例えば、His tag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、FactorXa配列等）などのアミノ酸配列を付加したものも本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質に含まれる。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、長鎖のdsRNAを特定の長さのdsRNAにすることができる。すなわち、本発明においては使用するdsRNA分解活性を有するタンパク質を選択することにより、所望の特定の長さのdsRNAを調製することができる。当該特定の長さのdsRNAは、特に限定はされないが例えば、約10～

100塩基対の範囲、好ましくは約15～30塩基対の範囲、特に好ましくは約20～25塩基対の範囲中の特定の長さのdsRNAが例示される。

また、従来市販されている酵素によって、基質として用いたdsRNAは完全に分解されないのに対し、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、基質となる長鎖のdsRNAを実質的に全て切断することができる。従って、基質のdsRNAを全て切断することができ、なおかつその分解産物によるRNA干渉作用が同等であるので、基質となる長鎖のdsRNAのスケールダウン、ひいては未分解のdsRNA除去工程の省略も可能となる。

さらに、本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えばDicer変異体は、pH8.5以上のトリス-塩酸緩衝液中で塩化マグネシウムの存在下で保存することにより、4℃保存ならびに-20℃保存のいずれの場合においてもその活性を長期間安定に保持することができる。

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質は、下記(2)に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態であっても良い。特に限定はされないが、上記Dicer変異体と核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質が例示される。

【0030】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するための方法としては、コドン宿主での発現に適したものに変換するか、あるいはレアコドンに対する補強することを含む方法であっても良い。特に限定はされないが例えば、発現遺伝子のコドン改変を含む製造方法であってもよく、当該タンパク質のアミノ酸配列の一部又は全てをタンパク発現の至適のコドン状態に変換したもの、もしくはそれに準じる状態の宿主を用いて発現させることができる。前記至適のコドン状態、もしくはそれに準じる状態の宿主としては、特に限定はされないが例えば、特定のコドンを認識するtRNA量を遺伝子工学的に通常この細胞中で産生する量よりも数倍以上高めた宿主が例示される。当該宿主としては、大腸菌が例示され、例えばアルギニンのコドン(AGA、AGG)のtRNAを補充した大腸菌、さらにイソロイシン(AUA)、プロリン(CCC)、ロイシン(CUA)のtRNAを補充した大腸菌等が挙げられる。

さらに、コドン改変を行って、宿主中での目的のタンパク質の発現を向上させる方法を用いても良く、その際にmRNAの2次構造を考慮にいれても良い。

すなわち、発現遺伝子のコドン変換、補強等によりタンパク発現が向上するような方法であれば特に限定はされない。

【0031】

本発明のdsRNA分解活性を有するタンパク質を製造するためのベクターには、特に限定はなく、市販のベクター、発現系のいずれもが使用できる。特に、限定はされないが例えばpETシステム(ノバジェン社製)を用いることができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターが挙げられる。

本発明の製造方法の一態様としては、上記Dicer変異体を低温で機能し得るプロモーターを有するベクター、例えば国際公開第99/27117号パンフレットに記載のpCold系ベクターで製造する方法が例示される。

すなわち、本発明の製造方法においては、特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を保持できるタンパク質を発現できるベクターであればいずれもが好適に使用できる。

また、当該特定の長さのdsRNAを生成させ得る機能を最終的に保持できるタンパク質を得られるならば、タンパク発現時は封入体の形態であるがその後のリホールディング操作により当該機能を回復できるものを発現できるベクターも含まれる。

本発明の方法の一態様、例えば上記Dicer変異体を製造する場合においては、従来のヒト由来Dicerの全長を発現させた場合に比較して、生産量が向上し、さらに当該タンパク質の活性保持体の取得率も向上させることができる。

本発明の dsRNA 分解活性を有するタンパク質の製造方法においては、下記 (2) に記載の核酸結合活性を有するタンパク質、特に限定はされないが例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態で発現させる方法も含まれる。

【0032】

(2) 本発明の核酸結合活性を有するタンパク質による dsRNA の分解の促進方法並びに当該タンパク質を用いた RNA 合成促進方法

本発明の特定の長さの dsRNA を生成することを特徴とする dsRNA 分解の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的に dsRNA 分解活性を促進するものであれば特に限定はなく、例えば、上記 RNA 結合活性を有するタンパク質等が好適に使用できる。

当該 RNA 結合活性を有するタンパク質としては特に限定はないが、コールド ショック プロテイン (Csp: cold shock protein) が例示される。特に常温域で機能し得るコールドショックプロテインが好適に使用でき、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールドショックプロテインが好ましい。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号 9 記載のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 10 記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列) を有するサーモトガ マリティマ (Thermotoga maritima) 由来の CspB タンパク質が好適に使用できる。当該サーモトガ マリティマ由来の CspB タンパク質は、例えば、Thermotoga maritima strain MSB8 を、ドイッチェ ザムルンク フォン ミクロオルガニズメン ウント ツェルクルツレン GmbH より購入 (DSM3109) し、プロテイン サイエンス (Protein Science)、第 8 巻、394-403 頁 (1999) 記載の方法に従い遺伝子工学的に組換え体を製造することができる。さらに、低温で機能し得るプロモーターを有するベクターが好適に使用でき、例えば国際公開第 99/27117 号パブリケーションに記載の pCold 系ベクターが挙げられる。

当該 CspB タンパク質を dsRNA 分解活性を有するタンパク質と組み合わせることにより、当該 dsRNA 分解活性を促進させることができる。さらに本発明の方法は、上記 (1) 記載の特定の長さの dsRNA を生成させる dsRNA 分解活性を有するタンパク質、例えば Dicer 変異体、天然型 Dicer あるいは市販のリコンビナント Dicer のような機能的同等物のいずれにおいてもその特定の長さの dsRNA を生成させる活性を促進できる。

本発明の方法において、核酸結合活性を有するタンパク質と dsRNA 分解活性を有するタンパク質を組み合わせることにより、当該 dsRNA 分解活性を促進させることができ、得られる分解産物は核酸結合活性を有するタンパク質を組合わせなかった場合の分解産物と比べて、RNA 干渉作用において単位重量あたり同等の活性を有する。従って、核酸結合活性を有するタンパク質を使用することは、RNA 干渉において非常に有用である。

また、従来行われている方法では、基質として用いた dsRNA は完全に分解されないのに対し、本発明の方法において、基質となる長鎖の dsRNA を実質的に全て切断することができる。従って、基質の dsRNA を全て切断することができ、なおかつその分解産物による RNA 干渉作用が同等であれば、基質となる長鎖の dsRNA のスケールダウン、ひいては未分解の dsRNA 除去工程の省略も可能となる。

さらに、本発明の方法においては、当該核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 合成活性を有するタンパク質は、dsRNA 分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質の形態のものであってもよい。

【0033】

一方、本発明の RNA 合成の促進方法は、核酸結合活性を有するタンパク質の存在下に行うことを特徴とする。当該核酸結合タンパク質としては、結果的に RNA 合成活性を有するタンパク質の RNA 合成活性を促進するものであれば特に限定はなく、核酸結合活性を有するタンパク質、コールドショックプロテイン (Csp: cold shock protein) が好適に使用できる。当該コールド ショック プロテインは、特に限定は

されないが好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のものが好適に使用できる。当該コールドショックプロテインとしては特に限定はされないが、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列（配列表の配列番号10記載の塩基配列）を有するサーモトガ マリティマ（*Thermotoga maritima*）由来のCspBタンパク質が例示される。

当該CspBタンパク質をRNA合成系に共存させることにより、例えばRNAポリメラーゼのRNA合成活性を促進させることができる。当該タンパク質は、生成物が一本鎖あるいは二本鎖RNAのいずれの場合においても、その合成活性を促進することができる。

【0034】

さらに、本発明のRNA合成の促進方法は、長鎖dsRNAのみならず、短鎖dsRNA、例えばsiRNAの合成に利用することができる。当該siRNA合成においては、特に限定はされないがT7 RNAポリメラーゼ等を用いて、好ましくは約15～30塩基対、特に好ましくは約20～25塩基対のものを合成する際に利用できる。

【0035】

さらに本発明の方法においては、核酸結合活性を有するタンパク質がRNA合成活性を有するタンパク質によるdsRNAの合成ならびにdsRNA分解活性を有するタンパク質のdsRNA分解の二つの反応を促進するため、特にRNA干渉において重要なdsRNAの合成ならびにsiRNAの生成系に利用することができる。この場合、各タンパク質は別個であってもよいし、融合タンパク質の形態であってもよい。

【0036】

(3) 本発明の方法に使用される組成物

本発明の組成物は、特定の長さのdsRNAに分解する反応及び／又はRNAの合成反応を効率よく行うための組成物である。

当該組成物は、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン（Csp: cold shock protein）が好適に使用でき、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列（配列表の配列番号10記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列）を有するサーモトガ マリティマ（*Thermotoga maritima*）由来のCspBタンパク質が好ましい。

【0037】

本発明の組成物には、dsRNA分解活性を有するタンパク質及び／又はRNA合成活性を有するタンパク質を含んでいてもよい。特定の長さのdsRNAを生成し得るdsRNA分解活性を有するタンパク質としては、Dicerの機能ドメインを有するものが好ましく、例えば、RNase IIIa、bならびにdsRNA結合ドメインからなるタンパク質が好適に使用できる。特に限定はされないが例えば、上記(1)記載のDicer変異体、天然型Dicerあるいは、市販のリコンビナントDicerのような機能的同等物のいずれであっても良い。当該Dicer変異体を含む組成物としては、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列からなるもの、あるいは配列表の配列番号3又は16記載の塩基配列でコードされるアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。また、配列表の配列番号4又は17記載のアミノ酸配列において、一ないしは複数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入あるいは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質を含む組成物であってもよい。

上記dsRNA分解活性を有するタンパク質において、さらに発現ベクター由来の配列、例えば、発現あるいは翻訳増強配列（例えば、Perfect DB配列等）、発現タンパク質精製用のタグ配列（例えば、His tag配列等）、あるいは発現タンパク質のN末端側の付加配列を除去するための配列（例えば、Factor Xa配列等）などのアミノ酸配列を付加したタンパク質であっても良い。前記タンパク質としては、特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号12又は18記載のアミノ酸配列を有するdsRNA分解活性を有するタンパク質が挙げられる。さらに、本発明の組成物には、上記（

1) 記載の D i c e r 変異体を安定化させるための緩衝液を含んでもよい。

【0038】

さらに、RNA 合成活性を有するタンパク質としては、例えば T7 RNA ポリメラーゼ、T3 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼ等が好適に使用できる。

さらに本発明の組成物の別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質と特定の長さの ds RNA を生成し得る ds RNA 分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

本発明の組成物は、特定の長さの ds RNA への効率の良い分解及び／又は一本鎖あるいは 2 本鎖 RNA の合成反応を簡便に行なうことができる。

【0039】

また、本発明の組成物の一態様としては、長鎖 ds RNA のみならず、短鎖 ds RNA、例えば si RNA の合成に利用することができる組成物が挙げられる。当該組成物は、約 10～100 塩基対、好ましくは約 15～30 塩基対、特に好ましくは約 20～25 塩基対の ds RNA を合成する際に有効である。

【0040】

(4) 本発明の方法に使用されるキット

本発明の方法に使用されるキットは、特定の長さの ds RNA に分解する反応及び／又は RNA の合成反応を効率よく行うためのキットである。

当該キットは、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質を含み、当該核酸結合活性を有するタンパク質は特に限定はされないが、コールド ショック プロテインが好適であり、例えば、好熱性菌あるいは耐熱性菌由来のコールド ショック プロテイン (C s p : c o l d s h o c k p r o t e i n) が好適に使用でき、配列表の配列番号 9 記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ (T h e r m o t o g a m a r i t i m a) 由来の C s p B タンパク質が好適に使用できる。

【0041】

本発明のキットには、特定の長さの ds RNA を生成する活性を有する、ds RNA 分解活性を有するタンパク質及び／又は RNA 合成活性を有するタンパク質を含んでもよい。該 ds RNA 分解活性を有するタンパク質及び／又は RNA 合成活性を有するタンパク質としては、上記(3)で挙げられたものが好適に使用できる。さらに、本発明のキットには、上記(1)記載の D i c e r 変異体を安定化させるための緩衝液を含んでもよい。

さらに本発明のキットの別態様としては、上記(2)記載の核酸結合活性を有するタンパク質、例えば、RNA 結合活性を有するタンパク質と特定の長さの ds RNA を生成し得る ds RNA 分解活性を有するタンパク質との融合タンパク質及び／又は核酸結合活性を有するタンパク質と RNA 合成活性を有するタンパク質との融合タンパク質を含有していてもよい。

さらに、本発明のキットには、上記以外のコンポーネント、例えば反応の結果生成された特定の長さの ds RNA を精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。特に限定はされないが例えば、約 21 塩基対の si RNA を精製するための試薬、それを生体サンプルに導入する試薬等を含有していても良い。

本発明のキットを用いることで、特定の長さの ds RNA への効率の良い分解及び／又は RNA の合成を簡便に行なうことができる。

【0042】

また本発明のキットの一態様としては、長鎖 ds RNA のみならず、短鎖 ds RNA、例えば si RNA の合成に利用することができるキットが挙げられる。当該キットは、約 10～100 塩基対、好ましくは約 15～30 塩基対、特に好ましくは約 20～25 塩基対の ds RNA を合成する際に有効である。

【実施例】

【0043】

以下に実施例を挙げて本発明を更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではない。

また、本明細書に記載の操作のうち、プラスミドの調製、制限酵素消化などの基本的な操作については2001年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー発行、T. マニアティス (T. Maniatis) ら編集、モレキュラー クローニング: ア ラボラトリー マニュアル第3版 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed.) に記載の方法によった。

【0044】

実施例1 ヒト由来DicerのRNase IIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸1271~1924 (塩基番号3811~5772) よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号5及び6記載の塩基配列を有する合成プライマー1及び2をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー1は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号1271~1277に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー2は、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~36にもつ。

【0045】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鋳型DNA (ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製) 2 μ l、5 μ lの10 \times LA PCR buffer (タカラバイオ社製)、5 μ lのdNTP混合液 (タカラバイオ社製)、10pmolの合成プライマー1、10pmolの合成プライマー2、0.5UのTakara LA Taq (タカラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて全量を50 μ lとした。前記反応液をTakara PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

【0046】

反応終了後、該反応液5 μ lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約2kbpのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5 μ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素KpnI (タカラバイオ社製) 及び制限酵素HindIII (タカラバイオ社製) で2重消化し、1.0%アガロース電気泳動によりそのKpnI-HindIII消化物を抽出精製し、KpnI-HindIII消化DNA断片を得た。

【0047】

次に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1~6記載の方法に従い、pCold08NC2ベクターを調製した。

次に上記pCold08ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット (タカラバイオ社製) を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地 (アンピシリン50 μ g/ml含む) 上で生育させた。

【0048】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認し

、この組み換えプラスミドをpCold08 hDi-Rとした。当該プラスミドは、p lasmid pCold08 hDi-Rと命名、表示され、平成15年8月11日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566））にFERM P-19482として寄託されている。このpCold08 hDi-Rは、ヒト由来Dicer アミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸番号1271～1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号12に、塩基配列を配列表の配列番号13に示す。

【0049】

(2) 発現、精製及び各種buffer条件でのサンプル調製

上記(1)で調製したpCold08 hDi-Rを用いて大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、1% Triton (トライトン) X-100、1mM ジチオスレイトール、2mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離(11,000rpm 20分)により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0050】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose（キアゲン社製）にbuffer A[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を ϕ 15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

【0051】

洗浄後、3mlのbuffer D[20mM トリスー塩酸緩衝液(pH7.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、100mM イミダゾール]で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E[50mM トリスー塩酸緩衝液(pH8.0)、100mM 塩化ナトリウム、0.5mM EDTA、0.1%トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール]で透析を行ない、その後、セントリコン（アミコン社製）を用いて約10倍まで濃縮を行なった。この精製濃縮サンプルの一部について10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、分子量約76,800のところに目的タンパク質のバンドが確認された。さらに、当該サンプルについてAnti His HRP Conjugate（キアゲ

ン社製)を用い、その添付プロトコルに従って抗Hisタグ抗体を用いたウエスタンブロッティング検出を行なったところ、目的のタンパク質バンドが発色検出された。以下、このヒト由来Dicer RNase IIIドメインタンパク質をhDiRと称する。

【0052】

さらに上記方法ではbuffer Dでの溶出後、buffer E (これをタンパク質サンプルIとする)で透析を行なっているが、タンパク形状緩衝液の条件設定のため、以下の組成の緩衝液での透析も同様に実施した。

1: buffer Fを用いた透析 [50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] → タンパク質サンプルI

2: buffer Gを用いた透析 [50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] → タンパク質サンプルII

3: buffer Hを用いた透析 [50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.8)、100 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1%トリトンX-100、1 mM ジチオスレイトール] → タンパク質サンプルIV

【0053】

実施例2 dsRNA分解活性の測定

(1) 反応液の調製

上記実施例1-(2)で調製したタンパク質サンプルI~IVについてそのDicer活性を測定した。当該活性測定は以下のようにして行った。

まず、活性測定に用いた基質となるdsRNAは、TurboScript T7 Transcription kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

すなわち、プラスミドpQBI125 (和光純薬社製)に挿入されているRed-shift Green Fluorescent Protein (以下GFPと略称する)をコードする遺伝子(配列表の配列番号11)について、プラスミドpDON-AI (タカラバイオ社製)に挿入したpDON-rsGFPを鋳型とし、配列表の配列番号7記載のT7プロモーター配列をもった合成プライマー3と配列表の配列番号8記載の合成プライマー4を用いてPCRを行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNA polymeraseによるRNA合成反応により約700bpの長さのdsRNAを調製した。

【0054】

上記方法で調製したdsRNA 1 μ g、上記(2)で調製したhDiR 1 μ l、10 mM ATP溶液 1 μ l、50 mM 塩化マグネシウム溶液 1 μ l、5 \times 反応緩衝液(それぞれ最終透析に用いた緩衝液の5倍濃縮したもの) 2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。

【0055】

また、市販のDicer (GTS社製)の場合は、Dicer酵素液2 μ l、基質となるdsRNA 1 μ g、10 mM ATP溶液 1 μ l、50 mM 塩化マグネシウム溶液 0.5 μ l、付属の反応緩衝液 4 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。

【0056】

以上の反応液を調製し、37 $^{\circ}$ Cで17時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物の確認されたものを活性有とした。

【0057】

(2) 活性測定

上記(1)で調製した反応液の活性測定を行い、RNase IIIドメインタンパク質

(hDiR) への影響を検討した。さらに、各緩衝液中における安定性についても検討するため、精製直後のサンプルを用いた場合と、4℃及び-20℃条件で5日間保存したサンプルを用いた。その結果、特にタンパク質サンプルIII、タンパク質サンプルIVにおいては、4℃保存ならびに-20℃保存のいずれの場合においても市販Dicerと同じ大きさの約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、その活性を安定に保持していることが確認できた。

【0058】

以上のことから、ヒト由来DicerのRNaseIIIドメインタンパク質(hDiR)は、pH8.5以上のトリス-塩酸緩衝液中、塩化マグネシウムが存在する条件で保存することで活性を安定化できることが判明した。

【0059】

実施例3 dsRNA生産及び分解に寄与する因子の検討

(1) dsRNA生産及び分解に寄与する因子を検討するために、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質について検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質は入手が困難であった。従って、配列表の配列番号9記載のアミノ酸配列を有するサーモトガ マリティマ(Thermotoga maritima)由来のCspBタンパク質をモデルタンパク質として用いた。当該タンパク質は、プロテインサイエンス(Protein Science)第8巻、394-403頁(1999)記載の方法で調製した。

【0060】

(2) サーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA分解への効果

CspBを添加した形でのdsRNA分解活性は以下のように測定した。

すなわち、hDiRを酵素として用いた場合、実施例1-(2)で調製したhDiR(酵素液)1 μ l、上記(1)で調製したCspB溶液1 μ l、基質として実施例2-(1)で使用したdsRNA1 μ g、10mM ATP溶液1 μ l、50mM 塩化マグネシウム溶液1 μ l、5 \times 反応緩衝液[250mM トリス-塩酸(pH8.5)、500mM 塩化ナトリウム、0.5% Triton X-100、5mM DTT]2 μ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 μ lとしたものを反応液とした。また市販のDicerの場合は、添付資料記載の組成に基質となるdsRNAを1 μ g加え、これにnuclease free水を加えて、容量を10 μ lとしたものを反応液とした。なお市販のDicerについては、GTS社、Stratagene社、Invitrogen社のものを使用した。

【0061】

添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で4.6ng/ μ l、9.2ng/ μ l、18.4ng/ μ l、92ng/ μ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.5)を1 μ l添加した。

【0062】

以上の反応液を調製し、37℃で18時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い分解産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11(Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。その結果、市販Dicer及びRNaseIIIドメインタンパク質(hDiR)のいずれの場合においてもCspB添加によるdsRNAの分解量の向上が全ての添加量に関して確認できた。特に9.2ng/ μ lの前後で分解量が向上することが確認できた。

【0063】

すなわち、CspBを反応液中に添加することで、市販のDicer、RNaseIIIドメインタンパク質のいずれにおいてもdsRNA分解産物がより多く得られることが明らかとなった。

【0064】

(3) サーモトガ マリティマ由来CspBのRNA合成への効果

RNA干渉においては、dsRNAを合成するためにRNA合成系の活性を促進することも重要であるとの見地にに基づき、サーモトガ マリティマ由来CspBのRNA合成への効果を検討した。モデル系として、T7 RNAポリメラーゼ系を選択した。RNA合成系への影響については以下のようにして行った。すなわち、CspBを添加した形でのT7 RNAポリメラーゼによる転写量を目安とした。常法により調製したT7プロモーターを有するpET16b (ノバジェン社製) に配列表の配列番号11記載の塩基配列を有するrsGFP遺伝子を導入したプラスミドを鋳型DNAとして1 μ g、10 \times T7 RNAポリメラーゼ用緩衝液 (タカラバイオ社製) 2 μ l、50mM DTT 2 μ l、RNaseインヒビター (タカラバイオ社製) 0.4 μ l、25mM NTP 2 μ l、T7 RNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製) 1 μ l、CspB溶液 1 μ l、これにnuclease free水を加えて容量を20 μ lとしたものを反応液とし、37 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。なお本実施例でCspBタンパク質の濃度は終濃度で90ng/ μ l、180ng/ μ l、460ng/ μ l、920ng/ μ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) を1 μ l添加した。

反応後のサンプル2 μ lに、10 \times MOPS緩衝液 (200mM MOPS、50mM 酢酸ナトリウム、10mM EDTA、10mM EGTA) 2 μ l、ホルムアルデヒド 2 μ l、脱イオン化ホルムアミド 9 μ l及びnuclease free水 3 μ lを添加して70 $^{\circ}$ C、10分間保温し、その後氷中で1分間インキュベートした。これに10 \times loading buffer 2 μ lを添加して、1 \times MOPS緩衝液中でエチジウムブロマイドを含む1.25%アガロースゲルを用いて電気泳動解析を行なった。そのゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製) による画像解析によって、T7 RNAポリメラーゼによって合成されたmRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が460ng/ μ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上に、さらに920ng/ μ l添加した場合は約3倍になることが確認できた。

【0065】

(4) サーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA合成への効果

次にサーモトガ マリティマ由来CspBのdsRNA合成に対する影響について検討した。本実施例においては、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型を利用した。RNAへの転写については、市販のTurboScript T7 Transcription kit (ジーンセラピーシステムズ社製) を用いて、その添付プロトコルに従った。なお、この際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90ng/ μ l、180ng/ μ l、460ng/ μ l、920ng/ μ lになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) を1 μ l添加した。37 $^{\circ}$ C、4時間反応後に1 μ lのDNase Iを添加し、37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1 μ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルを上記(3)と同様の方法でT7 RNAポリメラーゼによって合成されたdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920ng/ μ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約2倍以上になることが確認できた。

【0066】

上記実施例と同様に別態様のT7 RNAポリメラーゼ転写系についても検討した。すなわち、実施例2-(1)で調製したdsRNA合成用鋳型1 μ g、10 \times T7 RNAポリメラーゼ緩衝液 (タカラバイオ社製) 1 μ l、50mM DTT 1 μ l、RNaseインヒビター (タカラバイオ社製) 0.2 μ l、25mM NTP 1 μ l、T7

RNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製) 0.5 μ l、CspB溶液 1 μ l、これにnuclease free水を加えて容量を10 μ lとしたものを反応液とし、37℃で4時間反応させた。なおこの際に添加したCspBタンパク質の濃度は終濃度で90 ng/ μ l、180 ng/ μ l、460 ng/ μ l、920 ng/ μ lになるようにし、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.5) を1 μ l添加した。反応後のサンプルにDNase I (タカラバイオ社製) を0.5 μ l加えて、37℃で15分間反応させた。この反応液の40倍希釈液1 μ lをエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル電気泳動に供した。そのゲルについてもdsRNAの定量を行なった。その結果、いずれの濃度においても転写産物量の向上が確認できた。特に、CspBの添加量が920 ng/ μ l以上の場合、転写産物量が無添加時の場合の約3倍以上なることが確認できた。

【0067】

以上のように、CspBを反応液中に添加することで、T7 RNAポリメラーゼによる転写産物がより多く得られることが明らかとなった。この効果は、1本鎖RNA合成ならびに2本鎖RNA合成のいずれの場合においても確認できた。

【0068】

実施例4 ヒト由来DicerのPAZ+RNase IIIドメインの発現

(1) 発現ベクターの構築

配列表の配列番号1記載のヒト由来Dicer アミノ酸配列のN末端側よりアミノ酸679~1924 (塩基番号2035~5772) よりなるポリペプチドを発現させるため、以下のようにして発現ベクターを構築した。

まず、ジーンバンク登録No. AB028449で公開されている塩基配列より、配列表の配列番号14及び15記載の塩基配列を有する合成プライマー5及び6をDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマー5は、制限酵素KpnIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号679~685に相当する塩基配列を塩基番号16~36にもつ合成DNAである。また、合成プライマー6は、制限酵素HindIIIの認識配列を塩基番号9~14に、さらにヒト由来Dicerのアミノ酸配列 (配列番号1) のアミノ酸番号1919~1924に相当する塩基配列を塩基番号18~35にもつ。

【0069】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、鋳型DNA (ヒトcDNAライブラリー、Human Pancreas、タカラバイオ社製) 2 μ l、5 μ lの10 \times LA PCR buffer (タカラバイオ社製)、5 μ lのdNTP混合液 (タカラバイオ社製)、10 pmolの合成プライマー5、10 pmolの合成プライマー6、0.5 UのTakara LA Taq (タカラバイオ社製) を加え、滅菌水を加えて全量を50 μ lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 3分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

【0070】

反応終了後、該反応液5 μ lを1.0%アガロースゲル電気泳動に供した。確認された目的の約2.7 kbpのDNAフラグメントを電気泳動ゲルより回収・精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5 μ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素KpnI (タカラバイオ社製) 及び制限酵素HindIII (タカラバイオ社製) で2重消化し、1.0%アガロースゲル電気泳動によりそのKpnI-HindIII消化物を抽出精製し、KpnI-HindIII消化DNA断片を得た。

【0071】

次に実施例1-(1)で調製したpCold08NC2ベクターを上記KpnI-HindIII消化DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記KpnI-HindIII消化DNA断片と混合し、D

NAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）上で生育させた。

【0072】

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シークエンシングすることにより確認し、この組み換えプラスミドをpCold08 hDi-ASIとした。当該プラスミドは、plasmid pCold08 hDi-ASIと命名、表示され、平成15年9月26日より独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566））にFERM P-19536として寄託されている。このpCold08 hDi-ASIは、ヒト由来Dicerアミノ酸配列（配列番号1）のアミノ酸番号679～1924のアミノ酸配列をコードする塩基配列（配列表の配列番号16記載の塩基配列、配列番号17記載のアミノ酸配列）を含むプラスミドである。前記プラスミドから発現させたタンパク質は、Perfect DB配列、His tag配列、並びにFactor Xa配列を有している。当該タンパク質のアミノ酸配列を配列表の配列番号18に、塩基配列を配列表の配列番号19に示す。

【0073】

（2）発現、精製

上記（1）で調製したpCold08 hDi-ASIを用いて大腸菌BL21-CodonPlus-RIL strain（ストラタジーン社製）を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）上で生育させた。生育したコロニーを2.5mlのLB液体培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）に植菌し、37℃で一晩培養した。この一部を100mlの同LB培地に植菌し、37℃で対数増殖期まで培養した。前記培養後、15℃に保温したインキュベーター内で10分間振とうした後、IPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、そのまま15℃で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、5mlの細胞破碎溶液[50mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.5）、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100、1mM ジチオスレイトール、1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離（11,000rpm 20分）により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0074】

上記上清の抽出液 約5mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

すなわち、樹脂容積にして1ml分のNi-NTA agarose（キアゲン社製）にbuffer A[20mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.5）、100mM 塩化ナトリウム、1mM ジチオスレイトール、1mM 塩化マグネシウム、0.1%トライトンX-100]を10ml添加し、混和後、1,500 rpmで数分間遠心し、上清を廃棄して、約1mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約5mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂を ϕ 15mmのカラムに充填し、5mlのbuffer Aで2回洗浄した。次に5mlのbuffer B[20mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.5）、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]で樹脂を洗浄後、5mlのbuffer C[20mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.5）、800mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1%トライトンX-100、40mM イミダゾール]、続いて5mlのbuffer Bで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

【0075】

洗浄後、3mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% トライトンX-100、100mM イミダゾール] で溶出操作を行った。次に、500mlのbuffer E [50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、0.1% トリトンX-100、1mM ジチオスレイトール] で透析を行ない、その後、セントリコン (アミコン社製) を用いて約10倍まで濃縮を行なった。その一部について10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、大腸菌BL21-Codon Plus-RIL strain (ストラタジーン社製) を宿主として用いたサンプルで分子量約144,000のところに目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。以下、このヒト由来Dicer PAZ+RNase IIIドメインタンパク質をhDi-ASIとする。

【0076】

(3) dsRNA分解活性の測定

上記実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、実施例2記載の方法でそのdsRNA分解活性を測定した。

その結果、電気泳動後にエチジウムブロマイド染色したゲルより、約21ヌクレオチドの分解産物が確認され、RNase IIIドメインタンパク質 (hDiR) とPAZ領域を含むタンパク質 (hDi-ASI) においてもdsRNA分解活性が確認された。

【0077】

さらに、凍結・融解における安定性についても検討するため、-80℃条件で上記タンパク質サンプルを凍結、その後、室温で融解させるという操作を6回、及び10回繰り返した。また、コントロールとして実施例1-(2)で調製したhDiRについても同様の検討を行った。

その結果、PAZ+RNase IIIドメインタンパク質 (hDi-ASI) の場合、凍結・融解を6回、10回繰り返しても分解活性を保持していた。一方、hDiRについては6回の凍結・融解まで活性は確認された。このことから、RNase IIIドメインにさらにPAZドメインを含むことにより当該タンパク質は、より多くの凍結・融解に対する安定性を獲得することが確認できた。

【0078】

(4) 分解に寄与する因子についての検討

上記実施例4-(2)で調製したhDi-ASIについて、常温域で核酸結合活性を有するタンパク質の影響を検討した。

上記核酸結合活性を有するタンパク質としては、上記実施例3で調製したサーモトガマリティマ由来のCspBタンパク質を用いた。また、dsRNA分解への効果については、以下のように測定した。

すなわち、実施例4-(2)で調製したhDi-ASI (酵素液) 1 μ l、実施例3で調製したCspB溶液 1 μ l、基質となるdsRNA 1 μ g、10mM ATP溶液 1 μ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 1 μ l、5 \times 反応緩衝液 [250mM トリス-塩酸 (pH 8.5)、750mM 塩化ナトリウム、0.5% トライトンX-100、5mM DTT] を2 μ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 μ lとしたものを反応液とした。CspBタンパク質の濃度は終濃度で9.2ng/ μ l、18.4ng/ μ l、92ng/ μ lになるように添加し、無添加の場合のコントロールとしてCspBの形状緩衝液である10mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) を1 μ l添加した。

以上の反応液を調製し、37℃で17時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製) による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。

その結果、hDi-ASIの場合においても、CspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認できた。特に9.2ng/ μ lの前後で分解量が向上することが確認できた。

【0079】

すなわち、CspBは、RNaseIIIドメインを含む天然型、あるいは変異型のヒト由来DicerのいずれにおいてもそのdsRNA分解活性を促進することが確認できた。

【0080】

実施例5

本発明のヒト由来hDiRを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のDicer (GTS社)を用いた。dsRNA分解産物の調製は、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR並びに市販のDicerを10単位用いて、dsRNA10 μ g分を、37℃、18時間で切断した。これらの切断産物をRNA Purification Column 1, 2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0081】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地 (SIGMA社製)で適当量 (cell数: 5×10^4) 24wellプレートにまき、一晚CO₂インキュベーター内で培養した。約80%コンフルントになった状態で50 μ lの無血清培地に3 μ lのTransIT 293 Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.3 μ gのpQBI25 (和光純薬社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。そこに4 μ lのTransIT-TKO試薬を加えて穏やかに混和し、室温で5分間放置した。そこに上記siRNAを500ng加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置し、これをDNA/siRNA溶液とした。Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 μ lになるように添加したものに、DNA/siRNA溶液を滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、0.3 μ gのpQBI25 (和光純薬社製)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO₂インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター (DNA)のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表1に示す。

【0082】

【表1】

導入サンプル	平均蛍光強度
コントロール (無添加)	8.09
コントロール (ベクターのみ)	1331.44
hDiR	14.92
市販Dicer	71.57

【0083】

表1に示したように、コントロール (ベクターのみ)と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示し、市販Dicerのものよりも強いRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0084】

実施例6

本発明のhDiRを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について、siRNAの添加量を換えて検討した。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR並びに市販のDicerを10 μ l用いて、dsRNA10 μ g分を、37℃、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ μ lになるように添加し、反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0085】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地 (SIGMA社製)で適当量 (cell数: 1.5×10^5) を24wellプレートにまき、一晚CO₂インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約95%コンフルントになった時点で、49 μ lの無血清培地に1 μ lのGenejuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.3 μ gのpQBI25 (和光純薬社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに47 μ lの無血清培地に3 μ lのRibojuice Transfection Reagent (タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、上記siRNA 166.7ng、55.6ng、18.5ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した2種類の溶液を、Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 μ lになるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター (DNA) のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO₂インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製)を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター (DNA) のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のrsGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表2に示す。

【0086】

【表2】

導入サンプル	平均蛍光強度 (相対値)
コントロール (無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7ng	18.21
hDiR 55.6ng	18.97
hDiR 18.5ng	32.67
市販Dicer 166.7ng	17.74
市販Dicer 55.6ng	19.80
市販Dicer 18.5ng	32.34

【0087】

表2に示したように、コントロール (ベクターのみ)と比較して平均蛍光強度の値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRがRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0088】

上記細胞サンプルについてtotal RNAを抽出しreal time RT-PCRに供しrsGFPのmRNAを定量する事で、RNA干渉の評価を行った。

【0089】

すなわち、siRNA導入後CO₂ インキュベーターで37℃、24時間培養した細胞からtrizole (Invitrogen社製) を使用してトータルRNAを抽出、精製した。なおこの際の作業は、添付のプロトコルに従って行った。そのトータルRNAを80ng、5×M-MLV buffer (タカラバイオ社製) 4μl、10mM dNTP (タカラバイオ社製) 1μl、random hexamer 100pmol、RNase Inhibitor (タカラバイオ社製) 20U、M-MLV Reverse Transcriptase 100U、を加え、滅菌水で全量を20μlとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ社製) にセットし、42℃ 10分、95℃ 2分の反応を行った。この反応液に20μlの反応希釈液 (1×M-MLV buffer、0.5mM dNTP mixture) を加え、これを10μlずつに分注した。前述の反応物10μlに、10×R-PCR buffer (タカラバイオ社製) 2.5μl、250mM Mg²⁺ 0.3μl、10mM dNTP 0.75μl、TaKaRa Ex Taq R-PCR (タカラバイオ社製) 1.25U、滅菌水で3000倍希釈したSYBR Green (タカラバイオ社製) 2.5μl、100% DMSO 1.25μlを加え、β-actin (タカラバイオ社製)、GAPDH (タカラバイオ社製)、rsGFP (rsGFP-F: 配列番号20、rsGFP-R: 配列番号21)、Neo (Neo-F: 配列番号22、Neo-R: 配列番号23) を検出するための合成プライマーを5pmolずつ加え、滅菌水で全量を25μlとした。前記反応液をSmart Cycler II Unit (タカラバイオ社製) にセットし、95℃、10秒で熱変性を行った後、95℃ 5秒、60℃ 20秒を1サイクルとする45サイクルの反応を行なった。得られたデータを解析することで、ヒト由来のβ-actin、GAPDH、および導入プラスミド由来のrsGFP、NeoのmRNA量を定量した。その結果を表3に示す。

【0090】

【表3】

導入サンプル	rsGFP mRNA量 (相対値)
コントロール (無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7ng	15.92
hDiR 55.6ng	22.72
hDiR 18.5ng	30.61
市販Dicer 166.7ng	14.77
市販Dicer 55.6ng	30.91
市販Dicer 18.5ng	35.84

【0091】

表3に示したように、コントロール (ベクターのみ) と比較してrsGFPのmRNA量が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDiRは、市販Dicerと同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiRは、RNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【0092】

実施例7

上記実施例1-(2)、実施例4-(2)で調製したサンプルについてそのdsRNA分解活性の基質となるdsRNAをルシフェラーゼ遺伝子より作製し評価した。実施例2-(1)と同様にdsRNAは、TurboScript T7 Transcript

ion kit (GTS社製)を用いて、その添付プロトコルに従って合成した。

【0093】

すなわち、プラスミドpGL3-Basicベクター(プロメガ社製)に挿入されているルシフェラーゼをコードする遺伝子について、プラスミドpGL3-Basicベクター(プロメガ社製)を鋳型とし、配列表の配列番号24記載のT7プロモーター配列をもったds1-1プライマーと配列表の配列番号25記載のds1-2プライマーを用いてPCR(増幅断片長約500塩基対)を行い、増幅産物を得た。次に得られた2本鎖DNAを鋳型として、T7 RNAポリメラーゼによるRNA合成反応により約500bpの長さのdsRNAを調製した。

【0094】

本発明のhDiR、hDi-ASIを用いて調製したsiRNAのRNA干渉の效果について検討した。対照として、市販のDicer(Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載のhDiR、実施例4-(2)記載のhDi-ASI並びに市販のDicerを10 μ l用いて、上記のdsRNA10 μ g分を、37 $^{\circ}$ C、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2ng/ μ lになるように添加し、反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1、2(Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0095】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10%FBSおよび1%penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適量(cell数:1.5 $\times 10^5$)24wellプレートにまき、一晚CO₂インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約95%コンフルントになった時点で、49 μ lの無血清培地に1 μ lのGenejuice Transfection Reagent(タカラバイオ社製)を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、0.5 μ gのpGL3-controlと0.1 μ gのpRL-TK(Promega社製)を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに47 μ lの無血清培地に3 μ lのRibojuce Transfection Reagent(タカラバイオ社製)を加えたものを用意し、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、上記siRNAを166.7ng、55.6ng、18.5ngを加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

このように調製した2種類の溶液を、Well中の10%FBSを含むD-MEM培地を250 μ lになるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター(DNA)のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後CO₂インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をDual Luciferase Reporter assay kit(Promega社製)を用いたアッセイに供することで、ベクター(DNA)のみを導入したものに対する、siRNAを添加した場合のGL3タンパク質発現の阻害効果を測定した。その結果を表4に示す。

【0096】

【表4】

導入 siRNA サンプル	GL3 発現量: 相対値
コントロール (無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 166.7 ng	25.70
hDiR 55.6 ng	38.90
hDiR 18.5 ng	74.51
hDi-ASI 166.7 ng	25.87
hDi-ASI 55.6 ng	25.00
hDi-ASI 18.5 ng	31.09
市販Dicer 166.7 ng	25.11
市販Dicer 55.6 ng	30.15
市販Dicer 18.5 ng	55.41

【0097】

表4では、コントロール (ベクターのみ) と比較してそのGL3発現量の値が小さいほどRNA干渉が起こっていると考えられる。従って、hDiR、hDi-ASIによって得られる siRNA は、市販Dicer と同様にRNA干渉効果を示すことが確認できた。

以上のことから、本発明のhDiR、hDi-ASIがRNA干渉のための siRNA 調製に有用であることが確認できた。

【0098】

実施例8

本発明のhDiR、hDi-ASIを用い、CspBを添加して調製した siRNA と無添加で調製した siRNA について、そのRNA干渉の効果について検討した。なお実際の操作は実施例7記載のルシフェラーゼを用いた方法に習った。対照として、市販のDicer (Gene Therapy Systems社製)を用いた。dsRNAの切断については、基本的に上記実施例2-(1)記載の方法で行った。すなわち、実施例1-(2)記載の方法で調整したhDiR、実施例4-(2)記載の方法で調整したhDi-ASI並びに市販のDicerを10 μ l用いて、上記のdsRNA 10 μ g分を、37℃、18時間で切断した。なおこの際には、実施例3-(2)で使用したCspBを最終濃度9.2 ng/ μ lになるように添加した場合と添加しない場合とで反応させた。

これらの切断産物をRNA Purification Column 1, 2 (Gene Therapy Systems社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0099】

【表5】

導入 siRNA サンプル	GL3 発現量: 相対値
コントロール (無添加)	0
コントロール (ベクターのみ)	100
hDiR 55.6 ng + CspB	9.66
hDiR 55.6 ng	16.40
hDi-ASI 55.6 ng + CspB	14.31
hDi-ASI 55.6 ng	13.19
市販Dicer 55.6 ng + CspB	10.40
市販Dicer 55.6 ng	12.07

【0100】

表5では、コントロール (ベクターのみ) と比較してそのGL3発現量の値が小さいほど

どRNA干渉が起こっていると考えられる。従って、CspBの添加、無添加サンプルの間に、RNA干渉効果の差はないことを示した。

以上のことからRNA干渉のためのsiRNA調製の際に、本発明のCspBがsiRNAに対し、質的な影響を与えないことが確認できた。

【0101】

実施例9 酵素の安定性

実施例4-(2)で精製したPAZドメイン+RNase IIIドメインタンパク質(hDi-ASI)にCspBを終濃度で92 ng/ μ lになるように加えたものを保存緩衝液I(50 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)、250 mM 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM DTT、0.1% Triton X-100、50% グリセロール)中で保存し、一定期間ごとに以下のようにして、そのdsRNA分解活性を測定した。実施例2-(1)で調製したdsRNA 1 μ g、上記4-(2)で調製したタンパク質サンプル 1 μ l、5 \times 反応緩衝液(100 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)、750 mM 塩化ナトリウム、12.5 mM 塩化マグネシウム) 2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。37℃で18時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。その結果、6ヶ月以上の保存サンプルにおいて約21塩基対の分解産物が確認され、dsRNA分解活性が確認された。一方、同緩衝液条件においては、RNase IIIドメインタンパク質(hDiR)にCspBを加えたものについて、活性が3ヶ月以上保持された。

【0102】

実施例10 pCold14-TmCspBの作製、組み換え体の培養、及び精製

(1) pCold14-TmCspBの作製

以下のThermotoga maritima由来のCspB(以降、TmCspBとする)のクローニングに際しては、プロテインサイエンス(Protein Science)、第8巻、394-403頁(1999)記載の配列(アミノ酸配列を配列番号9、塩基配列を配列番号10に示す。)を参照した。

まず、配列表の配列番号26及び27記載の塩基配列を有する合成プライマーE及びFをDNA合成機で合成し、常法により精製した。上記合成プライマーEは、制限酵素Nde Iの認識配列を塩基番号11~16に、さらにTmCspBのアミノ酸配列(配列番号26)のアミノ酸番号1~7に相当する塩基配列を塩基番号14~34にもつ合成DNAである。また、合成プライマーFは、制限酵素BamHIの認識配列を塩基番号11~16に、TmCspBのアミノ酸配列(配列番号26)のアミノ酸番号61~66に相当する塩基配列を塩基番号20~37にもつ合成DNAである。

【0103】

上記合成プライマーを用いて、PCRを行った。PCRの反応条件を以下に示す。

すなわち、実施例3-(1)の鋳型DNA 1 μ l(50 ng)、5 μ lの10 \times Ex Taq buffer(タカラバイオ社製)、5 μ lのdNTP混合液(タカラバイオ社製)、10 pmolの合成プライマーE、10 pmolの合成プライマーF、0.5 UのTakara Ex Taq(タカラバイオ社製)を加え、滅菌水を加えて全量を50 μ lとした。前記反応液をTaKaRa PCR Thermal Cycler SP(タカラバイオ社製)にセットし、94℃1分、55℃1分、72℃1分を1サイクルとする30サイクルの反応を行なった。

反応終了後、該反応液5 μ lを3.0%アガロースゲル電気泳動に供し、目的の約220 bpのDNAフラグメントを確認した。残りのPCR反応液を電気泳動し、そのフラグメントを回収、精製し、エタノール沈殿を行なった。エタノール沈殿後の回収DNAを5 μ lの滅菌水に懸濁し、制限酵素Nde I(タカラバイオ社製)及び制限酵素BamHI(タカラバイオ社製)で2重消化し、3.0%アガロース電気泳動によりそのNde I-BamHI消化物を抽出精製し、Nde I-BamHI消化DNA断片を得た。

【0104】

次に国際公開第99/27117号パンフレットの実施例1~6記載の方法に従い、pCold04NC2ベクターを調製した（以下、このpCold04NC2ベクターをpCold14ベクターと称する）。

【0105】

次に上記pCold14ベクターを、上記DNA断片を調製した時に用いたのと同じ制限酵素で切断し、末端を脱リン酸処理したものを調製し、上記NdeI-BamHI消化DNA断片と混合し、DNAライゲーションキット（タカラバイオ社製）を用いて連結した。その後、ライゲーション反応液20 μ lを用いて大腸菌JM109を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）上で生育させた。

目的のDNA断片が挿入されたプラスミドは、シーケンシングすることにより確認した。

【0106】

(2) CspBの5リットルジャーでの培養、及び精製

上記実施例10-(1)で調製したpCold14-TmCspBを用いて、大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5%（w/v）濃度の寒天を含むLB培地（アンピシリン50 μ g/ml含む）上で生育させた。生育したコロニーを30mlのLB液体培地（bacto-tryptone 0.3g、bacto-yeast extract 0.15g、NaCl 0.15g、アンピシリン1.5mg）に植菌し、37℃で一晩培養した。この培養液30ml分を3リットルのLB液体培地（bacto-tryptone 30g、bacto-yeast extract 15g、NaCl 15g、アンピシリン150mg）を含む5リットルジャーファーマンター（エイブル社製）に植菌後、150rpm、Air=0.5リットル/min、37℃の条件で対数増殖期まで培養し、その後、15℃に冷却した。冷却後にIPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、150rpm、Air=0.5リットル/min、15℃の条件で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、11gの湿菌体を得た。湿菌体11gを44mlのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）]に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離（10,000 \times g 20分）により上清の抽出液と沈殿とに分離した。この上清の抽出液をさらに超遠心分離（70,000 \times g 20分）により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

【0107】

上記上清の抽出液、約53mlを水浴上で熱処理（70℃、10分）を行い、遠心分離（10,000 \times g 20分）により上清と沈殿とに分離した。この熱処理上清に終濃度200mMとなるようにNaClを添加し、さらにbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）、200mM 塩化ナトリウム]で平衡化したAnion Exchanger DE52 10mlリットルを添加し、4℃で一晩緩やかに攪拌した。遠心分離（3,000 \times g 20分）により上清と沈殿とに分離し、上清をさらにガラスフィルターで濾過を行った。この濾液45mlにつき、3リットルのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）]に対して透析を行なった。

【0108】

ϕ 20mmのカラムに充填した樹脂容積にして100ml分のQ-Sepharose F.F.（アマシャム・バイオサイエンス社製）に透析後の液50mlを添加し、400mlのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）]で洗浄を行った。この非吸着画分を回収し、UF30,000カット Centriprep YM-30（MILLIPORE社製）を通過させた。このUF通過液260mlを ϕ 30mmのカラムに充填した40mlのHeparin Sepharose CL-6B（アマシャム・バイオサイエンス社製）に添加し、160mlのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）]で洗浄を行なった。その後、200mlのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.0）]の0~1M塩化ナトリウムグラジエントで目的タンパク質の溶出を行なった。トリシン-SDSポリアクリルアミド電気泳動

にて分子量約7,500の目的タンパク質が確認された画分を回収し、3リットルのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)] に対して透析を行なった。この透析後の液65mlをUF3,000カット Centriprep YM-3 (MILLIPORE社製)を用いて約144倍まで濃縮を行い、約450 μ lのタンパク質サンプルを得た。このタンパク質サンプルに等量のグリセロールを添加し、50%グリセロール溶液 (W/W) 850 μ lを得た。その一部についてトリシン-SDSポリアクリルアミド電気泳動に供したところ、分子量約7,500の位置に目的タンパク質の単一の染色バンドが確認された。

【0109】

(3) CspBタンパク質による切断活性の上昇について。

次に実施例1-(2)、実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプルについて、核酸結合活性を有するタンパク質 (CspB) の影響を検討した。なおこの際には、実施例10-(2)で調製したTmCspBを用いた。

すなわち、実施例1-(2)、実施例4-(2)で調製したタンパク質サンプル (hDi-R酵素液)、またはタンパク質サンプル (hDi-ASI酵素液) 1 μ l、実施例10-(2)で調製したCspB溶液 (92ng/ μ l) を1 μ l、実施例2-(1)で調製した基質となるdsRNA 1 μ g、5 \times 反応緩衝液 (100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、750mM 塩化ナトリウム、12.5mM 塩化マグネシウム) 2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。CspBタンパク質の濃度は終濃度で9.2ng/ μ lになる。また、この際のコントロールとして市販のDicerについても同様に行なった。市販のDicer (GTS社製) の場合は、酵素液 2 μ l、CspB溶液 1 μ l、基質となるdsRNA 1 μ g、10mM ATP溶液 1 μ l、50mM 塩化マグネシウム溶液 0.5 μ l、付属の反応緩衝液 4 μ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 μ lとしたものを反応液とした。さらに、TmCspBの代わりに1 μ lのnuclease free水を加えたものをネガティブコントロールとした。

以上の反応液を調製し、37℃で18時間反応後、5 μ lを15%ポリアクリルアミド電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11 (Nonlinear Dynamics社製) による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物の定量を行なった。

その結果、実施例10-(2)で発現、精製されたTmCspBは、実施例3-(1)で発現、精製されたTmCspBと同様に、dsRNAの分解量の向上が確認された。

【0110】

実施例11 hDi-ASIの30リットルジャーでの培養、及び精製

(1) 発現、精製

上記実施例4-(1)で調製したpCold08 hDi-ASIを用いて、大腸菌BL21を形質転換し、その形質転換体を1.5% (w/v) 濃度の寒天を含むLB培地 (アンピシリン50 μ g/ml含む) 上で生育させた。生育したコロニーを200mlのTB液体培地 (bacto-tryptone 2.4g、bacto-yeast extract 4.8g、glycerol 0.8ml、17mM KH₂PO₄、72mM K₂HPO₄、アンピシリン10mg) に植菌し、37℃で一晩培養した。この培養液200ml分を20リットルのTB液体培地 (bacto-tryptone 240g、bacto-yeast extract 480g、glycerol 80ml、17mM KH₂PO₄、72mM K₂HPO₄、アンピシリン1g) を含む30リットルジャーファーマンター (丸菱バイオエンジニアリング社製) に植菌後、100rpm、Air=6リットル/min、37℃の条件で対数増殖期まで培養し、その後、15℃に冷却した。冷却後にIPTGを終濃度1.0mMになるように添加し、100rpm、Air=6リットル/min、15℃の条件で24時間培養して発現誘導させた。その後菌体を遠心分離により集め、26gの湿菌体を得た。湿菌体の一部12gを48mlの細胞破碎溶液 [50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1

mM 塩化マグネシウム、プロテアーゼインヒビター (Complete、EDTA-free、ベーリンガーマンハイム社製) に再懸濁した。超音波破碎により菌体を破碎し、遠心分離 (12,000 rpm 30分) により上清の抽出液と沈殿とに分離した。

上記上清の抽出液 約56mlを用いてさらにニッケルカラムによる精製を以下のように行なった。

【0111】

すなわち、樹脂容積にして16ml分のNi-NTA agarose (キアゲン社製) に細胞破碎溶液を50ml添加し、混和後、1,500rpmで数分間遠心し、上清を廃棄する操作を2回繰り返して、約8mlの樹脂を回収した。菌体破碎液より調製した約56mlの上清を添加し、4℃で約1時間、ロータリーシェイカーで穏やかに混和した。その後、この目的タンパク質の吸着した樹脂をφ20mmのカラムに充填し、40mlの細胞破碎溶液 [50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、プロテアーゼインヒビター (Complete、EDTA-free、ベーリンガーマンハイム社製)] で洗浄した。次に40mlのbuffer A [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、20mM イミダゾール] で樹脂を洗浄後、40mlのbuffer B [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、20mM イミダゾール]、続いて40mlのbuffer Aで洗浄を行い目的以外の不要タンパク質の除去を行った。

洗浄後、24mlのbuffer C [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール、100mM イミダゾール] で溶出操作を行った。次に、300mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール] に対して透析を行なった。

【0112】

透析後の酵素溶液をφ10mmのカラムに充填した1mlのHeparin Sepharose CL-6B (アマシャムバイオサイエンス社製) に添加し、5mlのbuffer D [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、100mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール] で洗浄を行なった。次に、5mlのbuffer E [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、200mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]、その後、5mlのbuffer F [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、400mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール]、5mlのbuffer G [20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、800mM 塩化ナトリウム、1mM 塩化マグネシウム、10% グリセロール] でタンパク質の溶出を行なった。その後、各溶出サンプルについてCentricon YM-10 (アミコン社製) を用いて約20倍まで濃縮を行ない、約250μlのタンパク質サンプルを得た。その一部について10% SDSポリアクリルアミド電気泳動に供したところ、分子量約144,000の位置に目的タンパク質のバンドが確認され、これを以下の活性の確認に使用した。以上の過程で発現、精製されたものを、実施例4-(2)で大腸菌BL21-Codon Plus-RIL strain (ストラタジーン社製) を宿主として発現、精製したものと比較すると100ml培養液あたりの活性で約2倍程度の収量を得ることができた。

【0113】

(2) dsRNA分解活性の測定

上記実施例11-(1)で調製したタンパク質サンプルについて、実施例2-(1)で調製したdsRNA 1μg、上記11-(1)で調製したタンパク質サンプル 1μl、5×反応緩衝液 (100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.5)、750mM 塩化ナトリウム、12.5mM 塩化マグネシウム) 2μl、これにnuclease free水を加えて、全量を10μlとしたものを反応液とした。37℃で18時間反応後、

5 μ l を15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動、エチジウムブロマイドによる染色に供して切断産物の確認を行なった。その結果、約21塩基対の分解産物が確認され、dsRNA分解活性が確認された。

【0114】

(3) CspBタンパク質による切断活性の上昇について

次に実施例11-(1)で調製したタンパク質サンプルについて、核酸結合活性を有するタンパク質(CspB)の影響を検討した。

すなわち、実施例10-(3)と同様にして、実施例11-(1)で調製したタンパク質サンプル(酵素液)1 μ l、実施例10-(2)で調製したCspB溶液1 μ l、実施例2-(1)で調製した基質となるdsRNA1 μ g、5 \times 反応緩衝液(100mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.5)、750mM 塩化ナトリウム、12.5mM 塩化マグネシウム)2 μ l、これにnuclease free水を加えて、全量を10 μ lとしたものを反応液とした。CspBタンパク質の濃度は終濃度で9.2 ng/ μ l になるように添加した。また、この際のコントロールとして市販のDicerについても同様に行なった。市販のDicer(GTS社製)の場合は、酵素液2 μ l、CspB溶液1 μ l、基質となるdsRNA1 μ g、10mM ATP溶液1 μ l、50mM 塩化マグネシウム溶液0.5 μ l、付属の反応緩衝液4 μ l、これにnuclease free水を加えて、容量を10 μ lとしたものを反応液とした。なお、この際にはCspBの代わりにnuclease free水を加えたものをコントロールとした。

【0115】

以上の反応液を調製し、37℃で18時間反応後、5 μ l を15%ポリアクリルアミド電気泳動に供し、エチジウムブロマイドによる染色を行い切断産物を確認した。さらに、当該ゲルをTotal Lab ver. 1.11(Nonlinear Dynamics社製)による画像解析によって、約21ヌクレオチドのdsRNA分解物、並びに未切断dsRNAの解析を行なった。

その結果、本発明のPAZ+RNase IIIドメインを含む変異体タンパク質(hDi-ASI)を用いた場合において、CspB添加によるdsRNAの分解量の向上が確認でき、さらには、未切断の基質がほとんど存在せず、ほぼ全てが分解されていることが確認された。一方、市販のDicerの場合は、dsRNA分解の上昇が確認されるものの、半分程度の未切断の基質が存在していることが確認された。

すなわち、本発明のタンパク質を用いた場合、CspB添加により基質を完全に分解することが可能であることが明らかとなった。

【0116】

実施例12 hDi-ASIによる切断産物のRNAi効果

実施例11-(1)のタンパク質を用いて調製したsiRNAのRNA干渉の効果について検討した。対照として、市販のDicer(GTS社)を用いた。dsRNA分解産物の調製は、基本的に上記実施例11-(3)記載の方法で行った。なおhDi-ASIの場合には、実施例10-(2)で調製したCspBを終濃度で9.2 ng/ μ l になるように添加した。すなわち、実施例11-(1)記載の酵素にCspBを添加したもの、並びに市販のDicerを用いて、実施例2-(1)で調製したdsRNA10 μ g分を、37℃、18時間で切断した。これらの切断産物をMicrocon-100、Micropure-EZ(共にタカラバイオ社製)を用いて精製し、これらを以下のRNA干渉の評価に使用した。

【0117】

すなわち、siRNA導入を行なう24時間前に293細胞を、10% FBSおよび1% penicillin/streptomycinを含むD-MEM培地(SIGMA社製)で適当量(cell数: 1.5×10^5)を24well穴プレートにまき、一晚CO₂インキュベーター内で培養した。この培養細胞が約95%コンフルントになった時点で、49 μ lの無血清培地に1 μ lのGenejuice Transfecti

on Reagent (タカラバイオ社製) を加え、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、 $0.3 \mu\text{g}$ の pQBI25 (タカラバイオ社製) を加えて、穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

同時に、別チューブに $47 \mu\text{l}$ の無血清培地に $3 \mu\text{l}$ の Ribojuce Transfection Reagent (タカラバイオ社製) を加えたものを用意し、激しく攪拌した。室温で5分間放置し、上記 siRNA を 55.6 ng を加えて穏やかに混和し、5分間室温で放置した。

【0118】

このように調製した2種類の溶液を、Well中の10% FBSを含むD-MEM培地を $250 \mu\text{l}$ になるように添加したものに滴下し、Well内の溶液が均一になるように穏やかに混和を行なった。またコントロールとして、ベクター (DNA) のみを添加したもの、また滅菌水のみを加えたものも同時に行なった。その後 CO_2 インキュベーター内で24時間培養した。この細胞をFACS Vantage (ベクトン・ディッキンソン社製) を用いたフローサイトメトリーに供し、ベクター (DNA) のみを導入したものに対するDNA/siRNA溶液を導入した場合のrsGFP発現の阻害効果を測定した。その結果を表6に示す。

【0119】

【表6】

導入サンプル	平均蛍光強度
コントロール (無添加)	3.52
コントロール (ベクターのみ)	1120.08
hDi-ASI + CspB	93.09
市販Dicer	278.59

【0120】

表6に示したように、コントロール (ベクターのみ) と比較してその平均蛍光値が小さいほどRNA干渉が起こっている。従って、hDi-ASI+CspBによって得られるsiRNAは、市販Dicerと同様にRNAi効果を示し、RNAiに有効であることが示された。さらに、効率よくsiRNAを生産することができ、同量のsiRNAを使用した場合、市販の酵素より高いRNAi効果が得られることを確認した。

以上のことから、本発明の方法で調製したタンパク質がRNA干渉のためのsiRNA調製に有用であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0121】

本発明により特定の長さのdsRNAを生成するdsRNA分解活性を有するタンパク質が提供される。また、本発明の方法によりRNA干渉等において有用な、特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法が提供される。さらに本発明の特定の長さのdsRNAへの分解促進方法及び／又はRNA合成促進方法を簡便に実施することができる組成物ならびにキットが提供される。

【配列表フリーテキスト】

【0122】

SEQ ID NO:3; A gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:4; An amino acid sequence of human dicer mutant

SEQ ID NO:5; Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:6; Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:7; Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:8; Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

SEQ ID NO:14; Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

SEQ ID NO:15; Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant
SEQ ID NO:16; A gene encoding human dicer mutant
SEQ ID NO:17; An amino acid sequence of human dicer mutant
SEQ ID NO:18; An amino acid sequence of human dicer mutant
SEQ ID NO:19; A gene encoding human dicer mutant
SEQ ID NO:20; Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP
SEQ ID NO:21; Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP
SEQ ID NO:22; Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo
SEQ ID NO:23; Synthetic primer Neo-R to amplify a gene encoding Neo
SEQ ID NO:24; Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase
SEQ ID NO:25; Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase
SEQ ID NO:26; Synthetic primer E to amplify a gene encoding CspB
SEQ ID NO:27; Synthetic primer F to amplify a gene encoding CspB

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TAKARA BIO INC.

<120> The protein which has dsRNA decomposition activity, the dsRNA decomposition method and the RNA synthesis method using the protein which has nucleic acid binding activity

<130> T-1882

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1924

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Lys	Ser	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Met	Ala	Gly	Leu	Gln	Leu
1				5				10					15		

Met	Thr	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Met	Gly	Pro	Phe	Phe	Gly	Leu	Pro	Trp
			20					25					30		

Gln	Gln	Glu	Ala	Ile	His	Asp	Asn	Ile	Tyr	Thr	Pro	Arg	Lys	Tyr	Gln
		35					40					45			

Val	Glu	Leu	Leu	Glu	Ala	Ala	Leu	Asp	His	Asn	Thr	Ile	Val	Cys	Leu
	50					55					60				

Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Thr	Phe	Ile	Ala	Ser	Thr	Thr	Leu	Leu	Lys
65					70					75					80

Ser	Cys	Leu	Tyr	Leu	Asp	Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Ala	Arg	Asn	Gly	Lys
				85					90					95	

Arg	Thr	Val	Phe	Leu	Val	Asn	Ser	Ala	Asn	Gln	Val	Ala	Gln	Gln	Val
				100					105				110		

Ser Ala Val Arg Thr His Ser Asp Leu Lys Val Gly Glu Tyr Ser Asn
115 120 125

Leu Glu Val Asn Ala Ser Trp Thr Lys Glu Arg Trp Asn Gln Glu Phe
130 135 140

Thr Lys His Gln Val Leu Ile Met Thr Cys Tyr Val Ala Leu Asn Val
145 150 155 160

Leu Lys Asn Gly Tyr Leu Ser Leu Ser Asp Ile Asn Leu Leu Val Phe
165 170 175

Asp Glu Cys His Leu Ala Ile Leu Asp His Pro Tyr Arg Glu Phe Met
180 185 190

Lys Leu Cys Glu Ile Cys Pro Ser Cys Pro Arg Ile Leu Gly Leu Thr
195 200 205

Ala Ser Ile Leu Asn Gly Lys Trp Asp Pro Glu Asp Leu Glu Glu Lys
210 215 220

Phe Gln Lys Leu Glu Lys Ile Leu Lys Ser Asn Ala Glu Thr Ala Thr
225 230 235 240

Asp Leu Val Val Leu Asp Arg Tyr Thr Ser Gln Pro Cys Glu Ile Val
245 250 255

Val Asp Cys Gly Pro Phe Thr Asp Arg Ser Gly Leu Tyr Glu Arg Leu
260 265 270

Leu Met Glu Leu Glu Glu Ala Leu Asn Phe Ile Asn Asp Cys Asn Ile
275 280 285

Ser Val His Ser Lys Glu Arg Asp Ser Thr Leu Ile Ser Lys Gln Ile
290 295 300

Leu Ser Asp Cys Arg Ala Val Leu Val Val Leu Gly Pro Trp Cys Ala
305 310 315 320

Asp Lys Val Ala Gly Met Met Val Arg Glu Leu Gln Lys Tyr Ile Lys
325 330 335

His Glu Gln Glu Glu Leu His Arg Lys Phe Leu Leu Phe Thr Asp Thr
340 345 350

Phe Leu Arg Lys Ile His Ala Leu Cys Glu Glu His Phe Ser Pro Ala
355 360 365

Ser Leu Asp Leu Lys Phe Val Thr Pro Lys Val Ile Lys Leu Leu Glu
370 375 380

Ile Leu Arg Lys Tyr Lys Pro Tyr Glu Arg His Ser Phe Glu Ser Val
385 390 395 400

Glu Trp Tyr Asn Asn Arg Asn Gln Asp Asn Tyr Val Ser Trp Ser Asp
405 410 415

Ser Glu Asp Asp Asp Glu Asp Glu Glu Ile Glu Glu Lys Glu Lys Pro
420 425 430

Glu Thr Asn Phe Pro Ser Pro Phe Thr Asn Ile Leu Cys Gly Ile Ile
435 440 445

Phe Val Glu Arg Arg Tyr Thr Ala Val Val Leu Asn Arg Leu Ile Lys
450 455 460

Glu Ala Gly Lys Gln Asp Pro Glu Leu Ala Tyr Ile Ser Ser Asn Phe
465 470 475 480

Ile Thr Gly His Gly Ile Gly Lys Asn Gln Pro Arg Asn Asn Thr Met
485 490 495

Glu Ala Glu Phe Arg Lys Gln Glu Glu Val Leu Arg Lys Phe Arg Ala
500 505 510

His Glu Thr Asn Leu Leu Ile Ala Thr Ser Ile Val Glu Glu Gly Val
515 520 525

Asp Ile Pro Lys Cys Asn Leu Val Val Arg Phe Asp Leu Pro Thr Glu
530 535 540

Tyr Arg Ser Tyr Val Gln Ser Lys Gly Arg Ala Arg Ala Pro Ile Ser
545 550 555 560

Asn Tyr Ile Met Leu Ala Asp Thr Asp Lys Ile Lys Ser Phe Glu Glu
565 570 575

Asp Leu Lys Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Ile Leu Arg Asn Lys Cys
580 585 590

Ser Lys Ser Val Asp Thr Gly Glu Thr Asp Ile Asp Pro Val Met Asp
595 600 605

Asp Asp His Val Phe Pro Pro Tyr Val Leu Arg Pro Asp Asp Gly Gly
610 615 620

Pro Arg Val Thr Ile Asn Thr Ala Ile Gly His Ile Asn Arg Tyr Cys
625 630 635 640

Ala Arg Leu Pro Ser Asp Pro Phe Thr His Leu Ala Pro Lys Cys Arg
645 650 655

Thr Arg Glu Leu Pro Asp Gly Thr Phe Tyr Ser Thr Leu Tyr Leu Pro
660 665 670

Ile Asn Ser Pro Leu Arg Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys
675 680 685

Val Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu
690 695 700

His Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu
705 710 715 720

Thr Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr
725 730 735

Ser Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro
740 745 750

Lys Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln
755 760 765

Pro Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro
770 775 780

Asp Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr
785 790 795 800

Thr Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro
805 810 815

His Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu
820 825 830

Leu Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile
835 840 845

Thr Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys
850 855 860

Pro Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val
865 870 875 880

Leu Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe
885 890 895

Lys Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro
900 905 910

Ser Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp
915 920 925

Tyr Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro
930 935 940

His Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser
945 950 955 960

Lys Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr
965 970 975

Lys Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val
980 985 990

Asp His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn
995 1000 1005

Gln Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys
1010 1015 1020

Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu
1025 1030 1035

Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala
1040 1045 1050

Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr
1055 1060 1065

Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly
1070 1075 1080

Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe
1085 1090 1095

Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser
1100 1105 1110

Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr
1115 1120 1125

Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr Ser
1130 1135 1140

Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu
1145 1150 1155

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp
1160 1165 1170

Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn
1175 1180 1185

Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln
1190 1195 1200

Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser
1205 1210 1215

Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro
1220 1225 1230

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn
1235 1240 1245

Ala Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met
1250 1255 1260

Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp
1265 1270 1275

Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly
1280 1285 1290

Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala
1295 1300 1305

Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser
1310 1315 1320

Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro
1325 1330 1335

Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val
1340 1345 1350

Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro
1355 1360 1365

Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp Leu
1370 1375 1380

Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys
1385 1390 1395

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly
1400 1405 1410

Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser
1415 1420 1425

Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp
1430 1435 1440

Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met
1445 1450 1455

Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
1460 1465 1470

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys
1475 1480 1485

Ser Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe
1490 1495 1500

Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys
1505 1510 1515

Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser
1520 1525 1530

Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr
1535 1540 1545

Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp
1550 1555 1560

Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu
1565 1570 1575

Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu
1580 1585 1590

Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr
1595 1600 1605

Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser Cys
1610 1615 1620

Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
1625 1630 1635

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp
1640 1645 1650

His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe
1655 1660 1665

Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala
1670 1675 1680

Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr
1685 1690 1695

Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile
1700 1705 1710

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln
1715 1720 1725

His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn
1730 1735 1740

Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys
1745 1750 1755

Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp
1760 1765 1770

Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp
1775 1780 1785

Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp
1790 1795 1800

Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala
1805 1810 1815

Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp
1820 1825 1830

Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser
1835 1840 1845

Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu
1850 1855 1860

Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly
1865 1870 1875

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys
1880 1885 1890

Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg
1895 1900 1905

Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn
1910 1915 1920

Ser

<210> 2
<211> 5772
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgaaaagcc ctgctttgca acccctcagc atggcaggcc tgcagctcat gacccttgct 60
tcctcaccaa tgggtccttt ctttggactg ccatggcaac aagaagcaat tcatgataac 120
atttatacgc caagaaaata tcaggttgaa ctgcttgaag cagctctgga tcataatacc 180
atcgtctgtt taaacactgg ctcaggggaag acatttattg ctagtactac tctactaaag 240
agctgtctct atctagatct aggggagact tcagctagaa atggaaaaag gacggtgttc 300
ttgggtcaact ctgcaaacca ggttgctcaa caagtgtcag ctgtcagaac tcattcagat 360
ctcaagggtg gggaatactc aaacctagaa gtaaattgcat cttggacaaa agagagatgg 420
aaccaagagt ttactaagca ccaggttctc attatgactt gctatgtcgc cttgaatgtt 480
ttgaaaaatg gttacttata actgtcagac attaaccttt tgggtgttga tgagtgtcat 540
cttgcaatcc tagaccaccc ctatcgagaa tttatgaagc tctgtgaaat ttgtccatca 600
tgtcctcgca ttttgggact aactgcttcc attttaaatg ggaaatggga tccagaggat 660

ttggaagaaa agtttcagaa actagagaaa attcctaaga gtaatgctga aactgcaact 720
gacctggtgg tcttagacag gtatacttct cagccatgtg agattgtggt ggattgtgga 780
ccatttactg acagaagtgg gctttatgaa agactgctga tggaattaga agaagcactt 840
aattttatca atgattgtaa tatatctgta cattcaaaag aaagagattc tactttaatt 900
tcgaaacaga tactatcaga ctgtcgtgcc gtattggtag ttctgggacc ctggtgtgca 960
gataaagtag ctggaatgat ggtaagagaa ctacagaaat acatcaaaca tgagcaagag 1020
gagctgcaca ggaaattttt attgtttaca gacactttcc taaggaaaat acatgcacta 1080
tgtgaagagc acttctcacc tgcctcactt gacctgaaat ttgtaactcc taaagtaatc 1140
aaactgctcg aaatcttacg caaatataaa ccatatgagc gacacagttt tgaaagcggt 1200
gagtgggtata ataatagaaa tcaggataat tatgtgtcat ggagtgattc tgaggatgat 1260
gatgaggatg aagaaattga agaaaaagag aagccagaga caaattttcc ttctcctttt 1320
accaacattt tgtgcggaat tttttttgtg gaaagaagat acacagcagt tgtcttaaac 1380
agattgataa aggaagctgg caaacaagat ccagagctgg cttatatcag tagcaatttc 1440
ataactggac atggcattgg gaagaatcag cctcgcaaca acacgatgga agcagaattc 1500
agaaaacagg aagaggtact taggaaattt cgagcacatg agaccaacct gcttattgca 1560
acaagtattg tagaagaggg tgttgatata ccaaaatgca acttggtggt tcgttttgat 1620
ttgcccacag aatatcgatc ctatgttcaa tctaaaggaa gagcaagggc acccatctct 1680
aattatataa tgttagcgga tacagacaaa ataaaaagtt ttgaagaaga ccttaaaacc 1740
tacaaagcta ttgaaaagat cttgagaaac aagtgttcca agtcggttga tactggtgag 1800
actgacattg atcctgtcat ggatgatgat cacgttttcc caccatatgt gttgaggcct 1860
gacgatggtg gtccacgagt cacaatcaac acggccattg gacacatcaa tagatactgt 1920
gctagattac caagtgatcc gtttactcat ctagctccta aatgcagaac ccgagagttg 1980
cctgatggta cattttattc aactctttat ctgccaatta actcacctct tcgagcctcc 2040
attgttggtc caccaatgag ctgtgtacga ttggctgaaa gagttgtcgc tctcatttgc 2100
tgtgagaaac tgcacaaaat tggcgaactg gatgaccatt tgatgccagt tgggaaagag 2160

actgttaa atgaagagga gcttgatttg catgatgaag aagagaccag tgttccagga 2220
agaccagggt ccacgaaacg aaggcagtgc tacccaaaag caattccaga gtgtttgagg 2280
gatagttatc ccagacctga tcagccctgt tacctgtatg tgataggaat ggttttaact 2340
acacctttac ctgatgaact caactttaga aggcggaagc tctatcctcc tgaagatacc 2400
acaagatgct ttggaatact gacggccaaa cccatacttc agattccaca ctttcctgtg 2460
tacacacgct ctggagaggt taccatatcc attgagttga agaagtctgg tttcatgttg 2520
tctctacaaa tgcttgagtt gattacaaga cttcaccagt atatattctc acatattctt 2580
cggcttgaaa aacctgcact agaatttaaa cctacagacg ctgattcagc atactgtgtt 2640
ctacctctta atgttgtaa tgactccagc actttggata ttgactttaa attcatggaa 2700
gatattgaga agtctgaagc tcgcataggc attcccagta caaagtatac aaaagaaaca 2760
ccctttgttt ttaaattaga agattaccaa gatgccgtta tcattccaag atatcgcaat 2820
tttgatcagc ctcacgatt ttatgtagct gatgtgtaca ctgatcttac ccactcagt 2880
aaatttcctt cccctgagta tgaaactttt gcagaatatt ataaaacaaa gtacaacctt 2940
gacctaacca atctcaacca gccactgctg gatgtggacc acacatcttc aagacttaat 3000
ctttgacac ctcgacattt gaatcagaag gggaaagcgc ttcctttaag cagtgtgag 3060
aagaggaaag ccaaattgga aagtctgcag aataaacaga tactggttcc agaactctgt 3120
gctatacatc caattccagc atcactgtgg agaaaagctg tttgtctccc cagcatactt 3180
tatgccttc actgcctttt gactgcagag gagctaagag ccagactgc cagcgatgct 3240
ggcgtgggag tcagatcact tcctgcggat ttagatacc ctaacttaga cttcgggtgg 3300
aaaaaatcta ttgacagcaa atctttcatc tcaatttcta actcctcttc agctgaaaat 3360
gataattact gtaagcacag cacaattgtc cctgaaaatg ctgcacatca aggtgctaata 3420
agaacctcct ctctagaaaa tcatgaccaa atgtctgtga actgcagaac gttgctcagc 3480
gagtcccctg gtaagctcca cgttgaagtt tcagcagatc ttacagcaat taatggtctt 3540
tcttacaatc aaaatctcgc caatggcagt tatgatttag ctaacagaga cttttgccaa 3600
ggaaatcagc taaattacta caagcaggaa ataccctgctg aaccaactac ctcatttcc 3660

attcagaatt tatacagtta cgagaaccag cccagccca gcgatgaatg tactctcctg 3720
agtaataaat accttgatgg aaatgctaac aaatctacct cagatggaag tcctgtgatg 3780
gccgtaatgc ctggtacgac agacactatt caagtgtca agggcaggat ggattctgag 3840
cagagccctt ctattgggta ctctcaagg actcttggcc ccaatcctgg acttattctt 3900
caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt 3960
ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc acatatctat ttgcaactta ccctgatgcg 4020
catgagggcc gcctttcata tatgagaagc aaaaaggtca gcaactgtaa tctgtatcgc 4080
cttggaaaaa agaagggact acccagccgc atggtggtgt caatatitga tccccctgtg 4140
aattggcttc ctcttggtta tgtagtaaat caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa 4200
aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg gcgaatggca aactggatga ggattacgag 4260
gaggaggatg aggaggagga gagcctgatg tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat 4320
gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa catatcagat ttatagataa tatgttaatg 4380
gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct cttctcctt tttcaaccac tgattctgca 4440
tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc ttaggtagta tgccattttc atcagatttt 4500
gaggattttg actacagctc ttgggatgca atgtgctatc tggatcctag caaagctggt 4560
gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg aatccatcag aagaaaactg tgggtgttgac 4620
acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc 4680
atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct 4740
gctcagcttt tcctctgttc actggggctg aaggtgctcc cggtaatata aaggactgat 4800
cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag aatttcaaca gccaacaaaa gaacctttca 4860
gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa 4920
tatggttggt tgaagattcc accaagatgt atgtttgatc atccagatgc agataaaaca 4980
ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat tttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag 5040
aataaggctt accttctcca ggcttttaca catgcctcct accactacaa tactatcact 5100
gattgttacc agcgcttaga attcctggga gatgcgattt tggactacct cataaccaag 5160

cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc 5220
ctggtcaaca acaccatctt tgcacgctg gctgtaaagt acgactacca caagtacttc 5280
aaagctgtct ctctgagct ctccatgtc attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag 5340
aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa 5400
gaagaggata ttgaagttcc aaaggccatg ggggatatct ttgagtcgct tgctggtgcc 5460
atttacatgg atagtgggat gtcactggag acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg 5520
cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat gtaccccggt cccctgtgcg agaattgctt 5580
gaaatggaac cagaaactgc caaatctagc ccggctgaga gaacttacga cggaaggctc 5640
agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg 5700
attgccaaat ctgcagcagc aagaagagcc ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag 5760
gttcccaata gc 5772

<210> 3

<211> 1962

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 3

caagtgtca agggcaggat ggattctgag cagagccctt ctattgggta ctctcaagg 60
actcttgcc ccaatcctgg acttattctt caggctttga ctctgtcaaa cgctagtgat 120
ggatttaacc tggagcggct tgaaatgctt ggcgactcct ttttaaagca tgccatcacc 180
acatatctat ttgcaactta ccctgatgcg catgagggcc gcctttcata tatgagaagc 240
aaaaagggtca gcaactgtaa tctgtatcgc cttggaaaaa agaagggact acccagccgc 300
atgggtggtgt caatatttga tccccctgtg aattggcttc ctcttggtta ttagtaaat 360
caagacaaaa gcaacacaga taaatgggaa aaagatgaaa tgacaaaaga ctgcatgctg 420
gcgaatggca aactggatga ggattacgag gaggaggatg aggaggagga gacctgatg 480
tggagggctc cgaaggaaga ggctgactat gaagatgatt tcctggagta tgatcaggaa 540

catatcagat ttatagataa tatgttaatg gggtcaggag cttttgtaaa gaaaatctct 600
ctttctcctt tttcaaccac tgattctgca tatgaatgga aaatgcccaa aaaatcctcc 660
ttaggtagta tgccattttc atcagatttt gaggattttg actacagctc ttgggatgca 720
atgtgctatc tggatcctag caaagctgtt gaagaagatg actttgtggt ggggttctgg 780
aatccatcag aagaaaactg tgggtgtgac acgggaaagc agtccatttc ttacgacttg 840
cacactgagc agtgtattgc tgacaaaagc atagcggact gtgtggaagc cctgctgggc 900
tgctatttaa ccagctgtgg ggagagggct gctcagcttt tcctctgttc actggggctg 960
aaggtgctcc cggtaatata aaggactgat cgggaaaagg ccctgtgccc tactcgggag 1020
aatttcaaca gccaacaaaa gaacctttca gtgagctgtg ctgctgcttc tgtggccagt 1080
tcacgctctt ctgtattgaa agactcggaa tatggttgtt tgaagattcc accaagatgt 1140
atgtttgatc atccagatgc agataaaaca ctgaatcacc ttatatcggg gtttgaaaat 1200
tttgaaaaga aaatcaacta cagattcaag aataaggctt accttctcca ggcttttaca 1260
catgcctcct accactacaa tactatcact gattgttacc agcgcttaga attcctggga 1320
gatgcgattt tggactacct cataaccaag cacctttatg aagacccgcg gcagcactcc 1380
ccgggggtcc tgacagacct gcggtctgcc ctggtcaaca acaccatctt tgcacgctg 1440
gctgtaaagt acgactacca caagtacttc aaagctgtct ctctgagct cttccatgtc 1500
attgatgact ttgtgcagtt tcagcttgag aagaatgaaa tgcaaggaat ggattctgag 1560
cttaggagat ctgaggagga tgaagagaaa gaagaggata ttgaagticc aaaggccatg 1620
ggggatatatt ttgagtcgct tgctggtgcc atttacatgg atagtgggat gtcactggag 1680
acagtctggc aggtgtacta tcccatgatg cggccactaa tagaaaagtt ttctgcaaat 1740
gtaccccggt cccctgtgcg agaattgctt gaaatggaac cagaaactgc caaathtagc 1800
ccggctgaga gaacttacga cggaaggctc agagtcactg tggaagtagt aggaaagggg 1860
aaatttaaag gtgttggtcg aagttacagg attgccaaat ctgcagcagc aagaagagcc 1920
ctccgaagcc tcaaagctaa tcaacctcag gttcccaata gc 1962

<211> 654
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant.

<400> 4

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly
1 5 10 15

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala
20 25 30

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu
35 40 45

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe
50 55 60

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser
65 70 75 80

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly
85 90 95

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp
100 105 110

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys
115 120 125

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys
130 135 140

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met
145 150 155 160

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu

165

170

175

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser
180 185 190

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp
195 200 205

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met
210 215 220

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala
225 230 235 240

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val
245 250 255

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly
260 265 270

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp
275 280 285

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr
290 295 300

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu
305 310 315 320

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys
325 330 335

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser
340 345 350

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
355 360 365

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His
370 375 380

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn
385 390 395 400

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu
405 410 415

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys
420 425 430

Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile
435 440 445

Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu
450 455 460

Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu
465 470 475 480

Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu
485 490 495

Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn
500 505 510

Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu
515 520 525

Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe
530 535 540

Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu
545 550 555 560

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys

565

570

575

Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met
580 585 590

Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly
595 600 605

Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly
610 615 620

Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala
625 630 635 640

Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser
645 650

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 1 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 5

tcgagctcgg tacccaagt gctcaagggc aggatg

36

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 2 to amplify a gene encoding human dicer

<400> 6

tatctagaaa gcttttagct attgggaacc tgaggt

36

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 3 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 7

gggtaatacgc actcactata gggagaatgg ctagcaaagg ag

42

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic primer 4 to amplify a gene encoding red-shifted green fluorescence protein

<400> 8

gggtaatacgc actcactata gggagatcag ttgtacagtt ca

42

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Thermotoga maritima

<400> 9

Met Arg Gly Lys Val Lys Trp Phe Asp Ser Lys Lys Gly Tyr Gly Phe
1 5 10 15

Ile Thr Lys Asp Glu Gly Gly Asp Val Phe Val His Trp Ser Ala Ile
20 25 30

Glu Met Glu Gly Phe Lys Thr Leu Lys Glu Gly Gln Val Val Glu Phe
35 40 45

Glu Ile Gln Glu Gly Lys Lys Gly Pro Gln Ala Ala His Val Lys Val
50 55 60

Val Glu
65

<210> 10
<211> 198
<212> DNA
<213> *Thermotoga maritima*

<400> 10
atgagaggaa aggttaagtg gttcgattcc aagaagggt acggattcat caciaaggac 60
gaaggaggag acgtgttcgt acactgggtca gccatcgaaa tggaagggtt caaaactctg 120
aaggaaggcc aggtcgtcga gttcgagatt caggaaggca agaaagggtcc acaggcagcg 180
cacgtgaaag tagttgag 198

<210> 11
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> A gene encoding red-shifted green fluorescence protein.

<400> 11
atggctagca aaggagaaga actcttcact ggagttgtcc caattcttgt tgaattagat 60
ggtgatgtta acggccacaa gttctctgtc agtggagagg gtgaagggtga tgcaacatac 120
ggaaaactta ccctgaagtt catctgcact actggcaaac tgcctgttcc atggccaaca 180
ctagtacta ctctgtgcta tgggtgttcaa tgcttttcaa gatacccga tcatatgaaa 240
cggcatgact ttttcaagag tgccatgccc gaaggttatg tacaggaaag gaccatcttc 300
ttcaaagatg acggcaacta caagacacgt gctgaagtca agtttgaagg tgataccctt 360
gttaatagaa tcgagttaaa aggtattgac ttcaaggaag atggaaacat tctgggacac 420
aaattggaat acaactataa ctacacaat gtatacatca tggcagacaa acaaaagaat 480
ggaatcaaag tgaacttcaa gacccgccac aacattgaag atggaagcgt tcaactagca 540
gaccattatc aacaaaatac tccaattggc gatggccctg tccttttacc agacaacat 600
tacctgtcca cacaatctgc cttttcgaaa gatcccaacg aaaagagaga ccacatggtc 660
cttcttgagt ttgtaacagc tgctgggatt acacatggca tggatgaact gtacaactga 720

<210> 12

<211> 675
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 12

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln
 20 25 30

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly
 35 40 45

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn
 50 55 60

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile
 65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu
 85 90 95

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu
 100 105 110

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp
 115 120 125

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys
 130 135 140

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met
 145 150 155 160

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu

165

170

175

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn
195 200 205

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
210 215 220

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser
225 230 235 240

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr
245 250 255

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu
260 265 270

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys
275 280 285

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu
290 295 300

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu
305 310 315 320

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu
325 330 335

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg
340 345 350

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys
355 360 365

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser
370 375 380

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg
385 390 395 400

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile
405 410 415

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn
420 425 430

Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn
435 440 445

Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile
450 455 460

Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His
465 470 475 480

Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr
485 490 495

Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys
500 505 510

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe
515 520 525

Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg
530 535 540

Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala
545 550 555 560

Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser

565

570

575

Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg
 580 585 590

Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg
 595 600 605

Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu
 610 615 620

Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys
 625 630 635 640

Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala
 645 650 655

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val
 660 665 670

Pro Asn Ser
 675

<210> 13
 <211> 2025
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 13
 atgaatcaca aagtgcac tcatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60
 cccaagtgc tcaagggcag gatggattct gagcagagcc cttctattgg gtactcctca 120
 aggactcttg gcccacatcc tggacttatt cttcaggctt tgactctgtc aaacgctagt 180
 gatggattta acctggagcg gcttgaaatg cttggcgact cctttttaaa gcatgccatc 240
 accacatatc tattttgcac ttaccctgat gcgcatgagg gccgcctttc atatatgaga 300

agcaaaaagg tcagcaactg taatctgtat cgccttggaa aaaagaaggg actaccagc 360
cgcatggttg tgtcaatatt tgatccccct gtgaattggc ttcctcctgg ttatgtagta 420
aatcaagaca aaagcaacac agataaatgg gaaaaagatg aaatgacaaa agactgcatg 480
ctggcgaatg gcaaactgga tgaggattac gaggaggagg atgaggagga ggagagcctg 540
atgtggaggg ctccgaagga agaggctgac tatgaagatg atttcctgga gtatgatcag 600
gaacatatca gatttataga taatatgtta atggggtcag gagcttttgt aaagaaaatc 660
tctctttctc ctttttcaac cactgattct gcatatgaat ggaaaatgcc caaaaaatcc 720
tccttaggta gtatgccatt ttcacagat tttgaggatt ttgactacag ctcttgggat 780
gcaatgtgct atctggatcc tagcaaagct gttgaagaag atgactttgt ggtggggttc 840
tggaatccat cagaagaaaa ctgtggtgtt gacacgggaa agcagtccat ttcttacgac 900
ttgcacactg agcagtgtat tgctgacaaa agcatagcgg actgtgtgga agccctgctg 960
ggctgctatt taaccagctg tggggagagg gctgctcagc ttttcctctg ttcactgggg 1020
ctgaagggtc tcccggtaat taaaaggact gatcgggaaa aggccctgtg ccctactcgg 1080
gagaatttca acagccaaca aaagaacctt tcagtgagct gtgctgctgc ttctgtggcc 1140
agttcacgct cttctgtatt gaaagactcg gaatatgggt gtttgaagat tccaccaaga 1200
tgtatgtttg atcatccaga tgcagataaa aactgaatc accttatatc ggggtttgaa 1260
aattttgaag aaaaatcaa ctacagattc aagaataagg cttaccttct ccaggctttt 1320
acacatgcct cctaccacta caatactatc actgattgtt accagcgctt agaattcctg 1380
ggagatgcga ttttggacta cctcataacc aagcaccttt atgaagacc gcggcagcac 1440
tccccggggg tcctgacaga cctgcggtct gccctggta acaacacat ctttgcacg 1500
ctggctgtaa agtacgacta ccacaagtac ttcaaagctg tctctcctga gctcttccat 1560
gtcattgatg actttgtgca gtttcagctt gagaagaatg aaatgcaagg aatggattct 1620
gagcttagga gatctgagga ggatgaagag aaagaagagg atattgaagt tccaaaggcc 1680
atgggggata tttttgagtc gcttgctggg gccatttaca tggatagtgg gatgtcactg 1740
gagacagtct ggcaggtgta ctatcccatg atgcggccac taatagaaaa gttttctgca 1800

aatgtacccc gttcccctgt gcgagaattg cttgaaatgg aaccagaaac tgccaaattt 1860
agccccggctg agagaactta cgacgggaag gtcagagtca ctgtggaagt agtaggaaag 1920
gggaaattta aaggtgttgg tcgaagttac aggattgcc aatctgcagc agcaagaaga 1980
gccctccgaa gcctcaaagc taatcaacct caggttccca atagc 2025

<210> 14
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic primer 5 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 14
tcgagctcgg taccgcctc cattgttggt ccacca 36

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic primer 6 to amplify a gene encoding human dicer mutant

<400> 15
tatctagaaa gcttttagct attggaacc tgaggt 36

<210> 16
<211> 3741
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 16
gcctccattg ttggtccacc aatgagctgt gtacgattgg ctgaaagagt tgcgctctc 60
atttgctgtg agaaactgca caaaattggc gaactggatg accatttgat gccagttggg 120
aaagagactg ttaaatatga agaggagctt gatttgcatt atgaagaaga gaccagtgtt 180
ccaggaagac caggttccac gaaacgaagg cagtgtctacc caaaagcaat tccagagtgt 240
ttgagggata gttatcccag acctgatcag ccctgttacc tgtatgtgat aggaatgggt 300

ttaactacac ctttacctga tgaactcaac tttagaaggc ggaagctcta tcctcctgaa 360
gataccacaa gatgctttgg aatactgacg gccaaacca tacctcagat tccacacttt 420
cctgtgtaca cagctctgg agaggttacc atatccattg agttgaagaa gtctggtttc 480
atgttgtctc tacaaatgct tgagttgatt acaagacttc accagtatat attctcacat 540
attcttcggc ttgaaaaacc tgcactagaa tttaaacctc cagacgctga ttcagcatac 600
tgtgttctac ctcttaatgt tgtaatgac tccagcactt tggatattga ctttaaattc 660
atggaagata ttgagaagtc tgaagctcgc ataggcattc ccagtacaaa gtatacaaaa 720
gaaacaccct ttgtttttta attagaagat taccaagatg ccgttatcat tccaagatat 780
cgcaattttg atcagcctca tcgattttat gtagctgatg tgtacactga tcttacccca 840
ctcagtaa at ttcctcccc tgagtatgaa acttttgcag aatattataa acaaagtac 900
aaccttgacc taaccaatct caaccagcca ctgctggatg tggaccacac atcttcaaga 960
cttaatcttt tgacacctcg acatttgaat cagaagggga aagcgcttcc tttaaagcagt 1020
gctgagaaga ggaaagccaa atgggaaagt ctgcagaata aacagatact gggtccagaa 1080
ctctgtgcta tacatccaat tccagcatca ctgtggagaa aagctgtttg tctccccagc 1140
atactttatc gccttactg ccttttgact gcagaggagc taagagccca gactgccagc 1200
gatgctggcg tgggagtcag atcacttcct gcggatttta gataccctaa cttagacttc 1260
gggtggaaaa aatctattga cagcaa atct ttcattctcaa tttctaactc ctcttcagct 1320
gaaaatgata attactgtaa gcacagcaca attgtccctg aaaatgctgc acatcaaggt 1380
gctaatagaa cctcctctct agaaaatcat gaccaa atgt ctgtgaactg cagaacgttg 1440
ctcagcgagt cccctggtaa gctccacgtt gaagtttcag cagatcttac agcaattaat 1500
gggtctttctt acaatcaaaa tctcgccaat ggcagttatg atttagctaa cagagacttt 1560
tgccaaggaa atcagctaaa ttactacaag caggaa atac ccgtgcaacc aactacctca 1620
tattccattc agaatttata cagttacgag aaccagcccc agcccagcga tgaatgtact 1680
ctcctgagta ataaataacct tgatggaaat gctaacaa at ctacctcaga tggaagtcct 1740
gtgatggccg taatgcctgg tacgacagac actattcaag tgctcaaggg caggatggat 1800

tctgagcaga gcccttctat tgggtactcc tcaaggactc ttggcccca tcctggactt 1860
attcttcagg ctttgactct gtcaaacgct agtgatggat ttaacctgga gcggcttgaa 1920
atgcttggcg actccttttt aaagcatgcc atcaccacat atctattttg cacttacct 1980
gatgcgcatg agggccgcct ttcatatatg agaagcaaaa aggtcagcaa ctgtaatctg 2040
tatgccttg gaaaaaagaa gggactaccc agccgcatgg tgggtgcaat attgatccc 2100
cctgtgaatt ggcttcctcc tggttatgta gtaaataag aaaaaagcaa cacagataaa 2160
tgggaaaaag atgaaatgac aaaagactgc atgctggcga atggcaaact ggatgaggat 2220
tacgaggagg aggatgagga ggaggagagc ctgatgtgga gggctccgaa ggaagaggct 2280
gactatgaag atgatttcct ggagtatgat caggaacata tcagatttat agataatatg 2340
ttaatgggggt caggagcttt tgtaaagaaa atctctcttt ctcctttttc aaccactgat 2400
tctgcatatg aatggaaaat gcccaaaaaa tcctccttag gtagtatgcc atttcatca 2460
gattttgagg atttgacta cagctcttgg gatgcaatgt gctatctgga tcctagcaaa 2520
gctgttgaag aagatgactt tgtggtgggg ttctggaatc catcagaaga aaactgtggt 2580
gttgacacgg gaaagcagtc catttccttac gacttgaca ctgagcagtg tattgctgac 2640
aaaagcatag cggactgtgt ggaagccctg ctgggctgct atttaaccag ctgtggggag 2700
agggctgctc agcttttcct ctgttcactg gggctgaagg tgctcccgtt aattaaaagg 2760
actgatcggg aaaaggccct gtgccctact cgggagaatt tcaacagcca aaaaaagac 2820
ctttcagtga gctgtgctgc tgcttctgtg gccagttcac gctcttctgt attgaaagac 2880
tcggaatatg gttgtttgaa gattccacca agatgtatgt ttgatcatcc agatgcagat 2940
aaaacactga atcaccttat atcggggttt gaaaattttg aaaagaaaat caactacaga 3000
ttcaagaata aggcttacct tctccaggct ttacacatg cctcctacca ctacaatact 3060
atcactgatt gttaccagcg cttagaattc ctgggagatg cgattttgga ctacctcata 3120
accaagcacc tttatgaaga ccgcggcag cactccccgg gggtcctgac agacctgcgg 3180
tctgccctgg tcaacaacac catctttgca tcgctggctg taaagtacga ctaccacaag 3240
tacttcaaag ctgtctctcc tgagctcttc catgtcattg atgactttgt gcagtttcag 3300

cttgagaaga atgaaatgca aggaatggat tctgagctta ggagatctga ggaggatgaa 3360
 gagaaagaag aggatattga agttccaaag gccatggggg atatTTTTga gtcgcttgct 3420
 ggtgccattt acatggatag tgggatgtca ctggagacag tctggcaggt gtactatccc 3480
 atgatgcggc cactaataga aaagttttct gcaaagtac cccgttcccc tgtgcgagaa 3540
 ttgcttgaag tggaaccaga aactgccaaa tttagcccgg ctgagagAAC ttacgacggg 3600
 aaggtcagag tcaactgtga agtagtagga aaggggaaat ttaaagggtg tggtcgaagt 3660
 tacaggattg ccaaactctgc agcagcaaga agagccctcc gaagcctcaa agctaataa 3720
 cctcaggttc ccaatagcta a 3741

<210> 17
 <211> 1246
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 17

Ala	Ser	Ile	Val	Gly	Pro	Pro	Met	Ser	Cys	Val	Arg	Leu	Ala	Glu	Arg
1				5				10						15	

Val	Val	Ala	Leu	Ile	Cys	Cys	Glu	Lys	Leu	His	Lys	Ile	Gly	Glu	Leu
			20					25					30		

Asp	Asp	His	Leu	Met	Pro	Val	Gly	Lys	Glu	Thr	Val	Lys	Tyr	Glu	Glu
		35					40					45			

Glu	Leu	Asp	Leu	His	Asp	Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Val	Pro	Gly	Arg	Pro
	50					55					60				

Gly	Ser	Thr	Lys	Arg	Arg	Gln	Cys	Tyr	Pro	Lys	Ala	Ile	Pro	Glu	Cys
65				70						75					80

Leu	Arg	Asp	Ser	Tyr	Pro	Arg	Pro	Asp	Gln	Pro	Cys	Tyr	Leu	Tyr	Val
				85					90					95	

Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp Glu Leu Asn Phe Arg
100 105 110

Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr Arg Cys Phe Gly Ile
115 120 125

Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His Phe Pro Val Tyr Thr
130 135 140

Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu Lys Lys Ser Gly Phe
145 150 155 160

Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr Arg Leu His Gln Tyr
165 170 175

Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro Ala Leu Glu Phe Lys
180 185 190

Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu Pro Leu Asn Val Val
195 200 205

Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys Phe Met Glu Asp Ile
210 215 220

Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser Thr Lys Tyr Thr Lys
225 230 235 240

Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr Gln Asp Ala Val Ile
245 250 255

Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His Arg Phe Tyr Val Ala
260 265 270

Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys Phe Pro Ser Pro Glu
275 280 285

Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys Tyr Asn Leu Asp Leu
290 295 300

Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp His Thr Ser Ser Arg
305 310 315 320

Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln Lys Gly Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys Trp Glu Ser Leu Gln
340 345 350

Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala Ile His Pro Ile Pro
355 360 365

Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro Ser Ile Leu Tyr Arg
370 375 380

Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg Ala Gln Thr Ala Ser
385 390 395 400

Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala Asp Phe Arg Tyr Pro
405 410 415

Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp Ser Lys Ser Phe Ile
420 425 430

Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp Asn Tyr Cys Lys His
435 440 445

Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln Gly Ala Asn Arg Thr
450 455 460

Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val Asn Cys Arg Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu Val Ser Ala Asp Leu
485 490 495

Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn Leu Ala Asn Gly Ser
500 505 510

Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly Asn Gln Leu Asn Tyr
515 520 525

Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr Ser Tyr Ser Ile Gln
530 535 540

Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro Ser Asp Glu Cys Thr
545 550 555 560

Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala Asn Lys Ser Thr Ser
565 570 575

Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly Thr Thr Asp Thr Ile
580 585 590

Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln Ser Pro Ser Ile Gly
595 600 605

Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly Leu Ile Leu Gln Ala
610 615 620

Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn Leu Glu Arg Leu Glu
625 630 635 640

Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile Thr Thr Tyr Leu Phe
645 650 655

Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu Ser Tyr Met Arg Ser
660 665 670

Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu Gly Lys Lys Lys Gly
675 680 685

Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp Pro Pro Val Asn Trp
690 695 700

Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys Ser Asn Thr Asp Lys
705 710 715 720

Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met Leu Ala Asn Gly Lys
725 730 735

Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Ser Leu Met
740 745 750

Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu Asp Asp Phe Leu Glu
755 760 765

Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn Met Leu Met Gly Ser
770 775 780

Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro Phe Ser Thr Thr Asp
785 790 795 800

Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser Ser Leu Gly Ser Met
805 810 815

Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr Ser Ser Trp Asp Ala
820 825 830

Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu Glu Asp Asp Phe Val
835 840 845

Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys Gly Val Asp Thr Gly
850 855 860

Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu Gln Cys Ile Ala Asp
865 870 875 880

Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu Gly Cys Tyr Leu Thr
885 890 895

Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu Cys Ser Leu Gly Leu
900 905 910

Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg Glu Lys Ala Leu Cys
915 920 925

Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys Asn Leu Ser Val Ser
930 935 940

Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser Ser Val Leu Lys Asp
945 950 955 960

Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg Cys Met Phe Asp His
965 970 975

Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile Ser Gly Phe Glu Asn
980 985 990

Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Lys Ala Tyr Leu Leu
995 1000 1005

Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His Tyr Asn Thr Ile Thr Asp
1010 1015 1020

Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp Ala Ile Leu Asp Tyr
1025 1030 1035

Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp Pro Arg Gln His Ser Pro
1040 1045 1050

Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala Leu Val Asn Asn Thr Ile
1055 1060 1065

Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp Tyr His Lys Tyr Phe Lys
1070 1075 1080

Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val Ile Asp Asp Phe Val Gln
1085 1090 1095

Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln Gly Met Asp Ser Glu Leu
1100 1105 1110

Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys Glu Glu Asp Ile Glu Val
1115 1120 1125

Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu Ser Leu Ala Gly Ala Ile
1130 1135 1140

Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu Thr Val Trp Gln Val Tyr
1145 1150 1155

Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu Lys Phe Ser Ala Asn Val
1160 1165 1170

Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu Glu Met Glu Pro Glu Thr
1175 1180 1185

Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr Tyr Asp Gly Lys Val Arg
1190 1195 1200

Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly Lys Phe Lys Gly Val Gly
1205 1210 1215

Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala Ala Ala Arg Arg Ala Leu
1220 1225 1230

Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln Val Pro Asn Ser
1235 1240 1245

<210> 18

<211> 1267

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> An amino acid sequence of human dicer mutant

<400> 18

Met Asn His Lys Val His His His His His His Ile Glu Gly Arg Asn
1 5 10 15

Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ile Val Gly Pro Pro Met Ser Cys Val
20 25 30

Arg Leu Ala Glu Arg Val Val Ala Leu Ile Cys Cys Glu Lys Leu His
35 40 45

Lys Ile Gly Glu Leu Asp Asp His Leu Met Pro Val Gly Lys Glu Thr
50 55 60

Val Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Asp Leu His Asp Glu Glu Glu Thr Ser
65 70 75 80

Val Pro Gly Arg Pro Gly Ser Thr Lys Arg Arg Gln Cys Tyr Pro Lys
85 90 95

Ala Ile Pro Glu Cys Leu Arg Asp Ser Tyr Pro Arg Pro Asp Gln Pro
100 105 110

Cys Tyr Leu Tyr Val Ile Gly Met Val Leu Thr Thr Pro Leu Pro Asp
115 120 125

Glu Leu Asn Phe Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Pro Pro Glu Asp Thr Thr
130 135 140

Arg Cys Phe Gly Ile Leu Thr Ala Lys Pro Ile Pro Gln Ile Pro His
145 150 155 160

Phe Pro Val Tyr Thr Arg Ser Gly Glu Val Thr Ile Ser Ile Glu Leu
165 170 175

Lys Lys Ser Gly Phe Met Leu Ser Leu Gln Met Leu Glu Leu Ile Thr
180 185 190

Arg Leu His Gln Tyr Ile Phe Ser His Ile Leu Arg Leu Glu Lys Pro
195 200 205

Ala Leu Glu Phe Lys Pro Thr Asp Ala Asp Ser Ala Tyr Cys Val Leu
210 215 220

Pro Leu Asn Val Val Asn Asp Ser Ser Thr Leu Asp Ile Asp Phe Lys
225 230 235 240

Phe Met Glu Asp Ile Glu Lys Ser Glu Ala Arg Ile Gly Ile Pro Ser
245 250 255

Thr Lys Tyr Thr Lys Glu Thr Pro Phe Val Phe Lys Leu Glu Asp Tyr
260 265 270

Gln Asp Ala Val Ile Ile Pro Arg Tyr Arg Asn Phe Asp Gln Pro His
275 280 285

Arg Phe Tyr Val Ala Asp Val Tyr Thr Asp Leu Thr Pro Leu Ser Lys
290 295 300

Phe Pro Ser Pro Glu Tyr Glu Thr Phe Ala Glu Tyr Tyr Lys Thr Lys
305 310 315 320

Tyr Asn Leu Asp Leu Thr Asn Leu Asn Gln Pro Leu Leu Asp Val Asp
325 330 335

His Thr Ser Ser Arg Leu Asn Leu Leu Thr Pro Arg His Leu Asn Gln
340 345 350

Lys Gly Lys Ala Leu Pro Leu Ser Ser Ala Glu Lys Arg Lys Ala Lys
355 360 365

Trp Glu Ser Leu Gln Asn Lys Gln Ile Leu Val Pro Glu Leu Cys Ala
370 375 380

Ile His Pro Ile Pro Ala Ser Leu Trp Arg Lys Ala Val Cys Leu Pro
385 390 395 400

Ser Ile Leu Tyr Arg Leu His Cys Leu Leu Thr Ala Glu Glu Leu Arg
405 410 415

Ala Gln Thr Ala Ser Asp Ala Gly Val Gly Val Arg Ser Leu Pro Ala
420 425 430

Asp Phe Arg Tyr Pro Asn Leu Asp Phe Gly Trp Lys Lys Ser Ile Asp
435 440 445

Ser Lys Ser Phe Ile Ser Ile Ser Asn Ser Ser Ser Ala Glu Asn Asp
450 455 460

Asn Tyr Cys Lys His Ser Thr Ile Val Pro Glu Asn Ala Ala His Gln
465 470 475 480

Gly Ala Asn Arg Thr Ser Ser Leu Glu Asn His Asp Gln Met Ser Val
485 490 495

Asn Cys Arg Thr Leu Leu Ser Glu Ser Pro Gly Lys Leu His Val Glu
500 505 510

Val Ser Ala Asp Leu Thr Ala Ile Asn Gly Leu Ser Tyr Asn Gln Asn
515 520 525

Leu Ala Asn Gly Ser Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Asp Phe Cys Gln Gly
530 535 540

Asn Gln Leu Asn Tyr Tyr Lys Gln Glu Ile Pro Val Gln Pro Thr Thr
545 550 555 560

Ser Tyr Ser Ile Gln Asn Leu Tyr Ser Tyr Glu Asn Gln Pro Gln Pro
565 570 575

Ser Asp Glu Cys Thr Leu Leu Ser Asn Lys Tyr Leu Asp Gly Asn Ala
580 585 590

Asn Lys Ser Thr Ser Asp Gly Ser Pro Val Met Ala Val Met Pro Gly
595 600 605

Thr Thr Asp Thr Ile Gln Val Leu Lys Gly Arg Met Asp Ser Glu Gln
610 615 620

Ser Pro Ser Ile Gly Tyr Ser Ser Arg Thr Leu Gly Pro Asn Pro Gly
625 630 635 640

Leu Ile Leu Gln Ala Leu Thr Leu Ser Asn Ala Ser Asp Gly Phe Asn
645 650 655

Leu Glu Arg Leu Glu Met Leu Gly Asp Ser Phe Leu Lys His Ala Ile
660 665 670

Thr Thr Tyr Leu Phe Cys Thr Tyr Pro Asp Ala His Glu Gly Arg Leu
675 680 685

Ser Tyr Met Arg Ser Lys Lys Val Ser Asn Cys Asn Leu Tyr Arg Leu
690 695 700

Gly Lys Lys Lys Gly Leu Pro Ser Arg Met Val Val Ser Ile Phe Asp
705 710 715 720

Pro Pro Val Asn Trp Leu Pro Pro Gly Tyr Val Val Asn Gln Asp Lys
725 730 735

Ser Asn Thr Asp Lys Trp Glu Lys Asp Glu Met Thr Lys Asp Cys Met
740 745 750

Leu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu Asp Tyr Glu Glu Glu Asp Glu Glu
755 760 765

Glu Glu Ser Leu Met Trp Arg Ala Pro Lys Glu Glu Ala Asp Tyr Glu
770 775 780

Asp Asp Phe Leu Glu Tyr Asp Gln Glu His Ile Arg Phe Ile Asp Asn
785 790 795 800

Met Leu Met Gly Ser Gly Ala Phe Val Lys Lys Ile Ser Leu Ser Pro
805 810 815

Phe Ser Thr Thr Asp Ser Ala Tyr Glu Trp Lys Met Pro Lys Lys Ser
820 825 830

Ser Leu Gly Ser Met Pro Phe Ser Ser Asp Phe Glu Asp Phe Asp Tyr
835 840 845

Ser Ser Trp Asp Ala Met Cys Tyr Leu Asp Pro Ser Lys Ala Val Glu
850 855 860

Glu Asp Asp Phe Val Val Gly Phe Trp Asn Pro Ser Glu Glu Asn Cys
865 870 875 880

Gly Val Asp Thr Gly Lys Gln Ser Ile Ser Tyr Asp Leu His Thr Glu
885 890 895

Gln Cys Ile Ala Asp Lys Ser Ile Ala Asp Cys Val Glu Ala Leu Leu
900 905 910

Gly Cys Tyr Leu Thr Ser Cys Gly Glu Arg Ala Ala Gln Leu Phe Leu
915 920 925

Cys Ser Leu Gly Leu Lys Val Leu Pro Val Ile Lys Arg Thr Asp Arg
930 935 940

Glu Lys Ala Leu Cys Pro Thr Arg Glu Asn Phe Asn Ser Gln Gln Lys
945 950 955 960

Asn Leu Ser Val Ser Cys Ala Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Arg Ser
965 970 975

Ser Val Leu Lys Asp Ser Glu Tyr Gly Cys Leu Lys Ile Pro Pro Arg
980 985 990

Cys Met Phe Asp His Pro Asp Ala Asp Lys Thr Leu Asn His Leu Ile
995 1000 1005

Ser Gly Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Asn Tyr Arg Phe Lys
1010 1015 1020

Asn Lys Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Phe Thr His Ala Ser Tyr His
1025 1030 1035

Tyr Asn Thr Ile Thr Asp Cys Tyr Gln Arg Leu Glu Phe Leu Gly
1040 1045 1050

Asp Ala Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Thr Lys His Leu Tyr Glu Asp
1055 1060 1065

Pro Arg Gln His Ser Pro Gly Val Leu Thr Asp Leu Arg Ser Ala
1070 1075 1080

Leu Val Asn Asn Thr Ile Phe Ala Ser Leu Ala Val Lys Tyr Asp
1085 1090 1095

Tyr His Lys Tyr Phe Lys Ala Val Ser Pro Glu Leu Phe His Val
1100 1105 1110

Ile Asp Asp Phe Val Gln Phe Gln Leu Glu Lys Asn Glu Met Gln
1115 1120 1125

Gly Met Asp Ser Glu Leu Arg Arg Ser Glu Glu Asp Glu Glu Lys
1130 1135 1140

Glu Glu Asp Ile Glu Val Pro Lys Ala Met Gly Asp Ile Phe Glu
1145 1150 1155

Ser Leu Ala Gly Ala Ile Tyr Met Asp Ser Gly Met Ser Leu Glu
1160 1165 1170

Thr Val Trp Gln Val Tyr Tyr Pro Met Met Arg Pro Leu Ile Glu
1175 1180 1185

Lys Phe Ser Ala Asn Val Pro Arg Ser Pro Val Arg Glu Leu Leu
1190 1195 1200

Glu Met Glu Pro Glu Thr Ala Lys Phe Ser Pro Ala Glu Arg Thr
1205 1210 1215

Tyr Asp Gly Lys Val Arg Val Thr Val Glu Val Val Gly Lys Gly
1220 1225 1230

Lys Phe Lys Gly Val Gly Arg Ser Tyr Arg Ile Ala Lys Ser Ala
1235 1240 1245

Ala Ala Arg Arg Ala Leu Arg Ser Leu Lys Ala Asn Gln Pro Gln
1250 1255 1260

Val Pro Asn Ser
1265

<210> 19
<211> 3804
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> A gene encoding human dicer mutant

<400> 19
atgaatcaca aagtgcacatca tcacatcatcat catatcgaag gtaggaattc gagctcggta 60
cccgccctcca ttgtttggtcc accaatgagc tgtgtacgat tggctgaaag agttgtcgct 120
ctcatttgct gtgagaaact gcacaaaatt ggcgaactgg atgaccattt gatgccagtt 180
gggaaagaga ctgttaaata tgaagaggag cttgatttgc atgatgaaga agagaccagt 240
gttccaggaa gaccaggttc cacgaaacga aggcagtgct acccaaaagc aattccagag 300
tgtttgaggg atagttatcc cagacctgat cagccctgtt acctgtatgt gataggaatg 360
gttttaacta cacctttacc tgatgaactc aactttagaa ggcggaagct ctatcctcct 420

gaagatacca caagatgctt tggaaactg acggccaaac ccataacctca gattccacac 480
tttctgtgt acacacgctc tggagagggt accatatcca ttgagttgaa gaagtctggt 540
ttcatgttgt ctctacaaat gcttgagttg attacaagac ttcaccagta tatattctca 600
catattcttc ggcttgaaaa acctgcacta gaatttaaac ctacagacgc tgattcagca 660
tactgtgttc tacctcttaa tgttgttaat gactccagca ctttggatat tgactttaaa 720
ttcatggaag atattgagaa gtctgaagct cgcataaggca ttcccagtac aaagtataca 780
aaagaaacac cctttgtttt taaattagaa gattaccaag atgccgttat cattccaaga 840
tatcgcaatt ttgatcagcc tcatcgattt tatgtagctg atgtgtacac tgatcttacc 900
ccactcagta aatttccttc ccttgagtat gaaacttttg cagaatatta taaaacaaag 960
tacaaccttg acctaaccaa tctcaaccag ccactgctgg atgtggacca cacatcttca 1020
agacttaatc ttttgacacc tcgacatttg aatcagaagg ggaaagcgct tcctttaagc 1080
agtgtgaga agaggaaagc caaatgggaa agtctgcaga ataaacagat actggttcca 1140
gaactctgtg ctatacatcc aattccagca tcaactgtgga gaaaagctgt ttgtctcccc 1200
agcatacttt atgccttca ctgccttttg actgcagagg agctaagagc ccagactgcc 1260
agcgatgctg gcgtgggagt cagatcactt cctgcggatt ttagataccc taacttagac 1320
ttcgggtgga aaaaatctat tgacagcaaa tctttcatct caatttctaa ctctcttca 1380
gctgaaaatg ataattactg taagcacagc acaattgtcc ctgaaaatgc tgcacatcaa 1440
ggtgctaata gaacctctc tctagaaaat catgacaaa tgtctgtgaa ctgcagaacg 1500
ttgctcagcg agtcccctgg taagctccac gttgaagttt cagcagatct tacagcaatt 1560
aatggtcttt cttaaatca aaatctcgcc aatggcagtt atgatttagc taacagagac 1620
ttttgccaag gaaatcagct aaattactac aagcaggaaa taccgtgca accaactacc 1680
tcatattcca ttcagaattt atacagttac gagaaccagc cccagcccag cgatgaatgt 1740
actctcctga gtaataaata ccttgatgga aatgctaaca aatctacctc agatggaagt 1800
cctgtgatgg ccgtaatgcc tggtagaca gacactattc aagtgtcaa gggcaggatg 1860
gattctgagc agagcccttc tattgggtac tcctcaagga ctcttggccc caatcctgga 1920

cttattcttc aggctttgac tctgtcaaac gctagtgatg gatttaacct ggagcggctt 1980
gaaatgcttg gcgactcctt tttaaagcat gccatcacca catacttatt ttgcacttac 2040
cctgatgcgc atgagggccg cctttcataat atgagaagca aaaaggctcag caactgtaat 2100
ctgtatcgcc ttggaaaaaa gaagggacta cccagccgca tgggtggtgtc aatatttgat 2160
ccccctgtga attggcttcc tcctggttat gtagtaaate aagacaaaag caacacagat 2220
aaatgggaaa aagatgaaat gacaaaagac tgcattgctgg cgaatggcaa actggatgag 2280
gattacgagg aggaggatga ggaggaggag agcctgatgt ggagggtctc gaaggaagag 2340
gctgactatg aagatgattt cctggagtat gatcaggaac atatcagatt tatagataat 2400
atgttaatgg ggtcaggagc ttttgtaaag aaaatctctc tttctccttt ttcaaccact 2460
gattctgcat atgaatggaa aatgcccaaa aaatcctcct taggtagtat gccattttca 2520
tcagattttg aggattttga ctacagctct tgggatgcaa tgtgctatct ggatcctagc 2580
aaagctgttg aagaagatga ctttgtggtg gggttctgga atccatcaga agaaaactgt 2640
gggtgtgaca cgggaaagca gtccatttct tacgacttgc aactgagca gtgtattgct 2700
gacaaaagca tagcggactg tgtggaagcc ctgctgggct gctatttaac cagctgtggg 2760
gagagggctg ctacagctttt cctctgttca ctggggctga aggtgctccc ggtaattaaa 2820
aggactgacg gggaaaaggc cctgtgccct actcgggaga atttcaacag ccaacaaaag 2880
aacctttcag tgagctgtgc tgctgcttct gtggccagtt cacgctcttc tgtattgaaa 2940
gactcggaaat atggttgttt gaagattcca ccaagatgta tgtttgatca tccagatgca 3000
gataaaacac tgaatcacct tatacggggg ttgaaaatt ttgaaaagaa aatcaactac 3060
agattcaaga ataaggctta cttctccag gcttttacac atgcctccta ccactacaat 3120
actatcactg attgttacca gcgcttagaa ttcttgggag atgcgatttt ggactacctc 3180
ataaccaagc acctttatga agaccgcgg cagcactccc cgggggtcct gacagacctg 3240
cggctctgcc tggtaacaa caccatcttt gcatcgctgg ctgtaaagta cgactaccac 3300
aagtacttca aagctgtctc tcctgagctc ttccatgtca ttgatgactt tgtgcagttt 3360
cagcttgaga agaatgaaat gcaaggaatg gattctgagc ttaggagatc tgaggaggat 3420

gaagagaaaag aagaggatat tgaagttcca aaggccatgg gggatatattt tgagtcgctt 3480
gctgggtgcca tttacatgga tagtgggatg tcaactggaga cagtctggca ggtgtactat 3540
cccatgatgc ggccactaat agaaaagttt tctgcaaatg taccctgttc ccctgtgcga 3600
gaattgcttg aaatggaacc agaaactgcc aaatttagcc cggctgagag aacttacgac 3660
gggaaggtca gagtcaactgt ggaagtagta ggaaagggga aatttaaagg tgttggtcga 3720
agttacagga ttgccaaatc tgcagcagca agaagagccc tccgaagcct caaagctaata 3780
caacctcagg ttcccaatag ctaa 3804

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer rsGFP-F to amplify a gene encoding rsGFP

<400> 20

gccacaacat tgaagatgga

20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer rsGFP-R to amplify a gene encoding rsGFP

<400> 21

gaaagggcag attgtgtgga

20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer Neo-F to amplify a gene encoding Neo

<400> 22

atagcgttgg ctaccctga

20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer Neo-R to amplify a gene encoding Neo

<400> 23

gaaggcgata gaaggcgatg

20

<210> 24
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-1 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 24

gggtaatacg actcactata gggagaatgg aagacgcaa aa

42

<210> 25
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer dsl-2 to amplify a gene encoding luciferase

<400> 25

gggtaatacg actcactata gggagagaac gtgtacatcg ac

42

<210> 26
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer E to amplify a gene encoding CspB

<400> 26

GAGCGGATAA CATATGAGAG GAAAGGTTAA GTGG

34

<210> 27
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic primer F to amplify a gene encoding CspB

<400> 27

GAGCGGATAA GGATCCTTAC TCAACTACTT TCACGTG

37

【書類名】要約書

【要約】

【課題】

特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質の提供、RNA 干渉等にご利用可能な特定の長さの dsRNA を効率よく生成させる方法並びに RNA 合成の促進方法を提供すること。

【解決手段】

長鎖の dsRNA に作用して特定の長さの dsRNA を生成させる活性を有する、dsRNA 分解活性を有するタンパク質、核酸結合活性を有するタンパク質、例えば RNA 結合活性を有するタンパク質の共存下で dsRNA に dsRNA 分解活性を持ったタンパク質を作用させることにより、特定の長さの dsRNA を効率よく調製できる方法及び当該核酸結合活性を有するタンパク質が dsRNA 合成に代表される RNA 合成反応においてもその効率を向上させる方法。

【選択図】 なし

特願 2004-086129

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[302019245]

1. 変更年月日

2002年 4月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

氏 名

タカラバイオ株式会社